

密级:

论文编号:



中国农业科学院

# 学位论文

## 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体的制备及 阻断 ELISA 检测方法的建立

硕士研究生: 郭镇洋

学 号: 82101215619

指 导 教 师: 彭金美 研究员

申请学位类别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所  
研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis**

## **Preparation of Monoclonal Antibodies against Porcine Pseudorabies Virus gE Protein and Establishment of a Blocking ELISA Detection Method**

**Candidate: GUO Zhenyang**

**Student ID: 82101215619**

**Supervisor: Professor PENG Jinmei**

**Degree Type: Master of Professional Degree in  
Veterinary Medicine**

**Major: Veterinary Medicine**

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute**

**Graduate School**

**June 2024**

## 摘要

猪伪狂犬病（PR）是由猪伪狂犬病病毒（PRV）引起的严重危害养殖业的一种重大传染病，该病在世界各国均有流行，自发生以来给养猪业造成了巨大的经济损失。2011年底，该病在国内许多免疫过疫苗的猪场再一次突然暴发。研究发现，新流行的毒株毒力增强，抗原性发生了变异，同时在遗传进化上相对于国外毒株和国内早期经典毒株逐渐形成了新的分支。面对新流行的 PRV 变异株，现有的疫苗并不能对猪只提供完全的保护，这也就为疫病的防控带来了巨大的困难。面对新流行的 PRV 变异株，除了疫苗免疫以外，对于野毒的监测也是必不可少的。尽管国外研制的 gE 抗体试剂盒可以很好的用于检测野毒，但截至目前为止国内开发的此类试剂盒与国外相比仍存在一定的差距，因此本研究的目的在于制备一株阻断性能良好的单抗作为检测抗体，同时制备出一株安全性更高的 PRV 弱毒株来作为包被抗原，最终建立特异性强、灵敏度高且安全性良好的 gE 抗体阻断 ELISA 方法。

本研究以灭活纯化的 PRV HeN1 株全病毒为免疫原，免疫小鼠制备单克隆抗体（MAB），并成功制备出了一株抗 PRV gE 蛋白的单克隆抗体细胞株，命名为 1C10A4。该单抗与 PRV 经典株（SC 株）和 PRV 变异株（HeN1 株）均具有良好的反应性；阻断 ELISA 结果显示，MAB-1C10A4 能够被 PRV 高免血清阻断，且高免血清在 1:3200 稀释梯度时对该单克隆抗体仍具有 50% 的阻断效力；B 细胞抗原表位鉴定结果显示，MAB-1C10A4 识别一个新的抗原表位 <sup>41</sup>PSAEVWD<sup>47</sup>，且该抗原表位在不同的 PRV 毒株中均高度保守。以上结果表明，本研究获得了一株具有保守抗原表位的单克隆抗体，且该单抗具备发展为抗体检测方法的潜力。

本研究进一步利用 MAB-1C10A4 建立了检测 gE 抗体的阻断 ELISA 方法。首先，利用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）作用于 LM-TK-细胞，将 PRV HeN1 株在该细胞上传代，最后筛选出了一株 TK 基因缺失的突变体，命名为 HeN1-ΔTK-2 株，该毒株在对 PRV 敏感动物小鼠中完全丧失致病力，表明其相对于亲本株 HeN1 株已明显减毒，在阻断 ELISA 方法中可作为安全的包被抗原。其次，通过对 HeN1-ΔTK-2 株进行灭活纯化制备包被抗原，结合 MAB-1C10A4，本研究成功建立了一种检测 PRV gE 抗体的阻断 ELISA，利用优化好的方法检测 400 份已知阴阳性的临床血清并读取 OD<sub>450nm</sub> 值，用 MedCalc v15.8 软件对结果进行 ROC 曲线和交互式点图分析，确定了该方法的判定结果：当 S/N 值 ≤ 0.5 时，为 gE 抗体阳性；当 S/N 值 > 0.5 时，为抗 gE 抗体阴性。最后，敏感性试验结果显示，本研究建立的 gE 抗体阻断 ELISA 方法对 PRV 阳性血清的敏感性高于商业化试剂盒 0~2 倍；特异性试验结果显示，该方法在检测多种病毒的特异性血清时，只有 PRV 特异性血清检测结果为阳性；重复性试验结果显示，批内和批间重复性的变异系数均小于 5%。在 492 份临床样品的检测中，本方法、IDEXX 试剂盒以及国产试剂盒的检测方法与 IFA 的符合率分别为 97.15%、95.73% 和 81.5%。此外，在检测免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势时，本研究开发的 gE 抗体检测方法与 IDEXX 试剂盒的检测结果一致，这两种方法都准确地呈现出免疫和攻毒后猪体内 gE 抗体水平的动态，同时，本方法相较于 IDEXX 试剂盒能够更早的检测到抗体的阳转。以上结果表明，本研究开发的 gE 抗体阻断 ELISA 方法能够很好的应用于 PRV 野毒感染的检测，为 PRV 的防控和净化提供技术支撑。

**关键词：**猪伪狂犬病病毒，单克隆抗体，抗原表位，阻断 ELISA

## Abstract

Porcine pseudorabies (PR) is a significant infectious disease caused by the porcine pseudorabies virus (PRV), presenting a serious threat to the swine industry. This disease is widespread in various countries globally, leading to substantial economic losses in the pig farming sector since its emergence. In 1979, China introduced the BarthaK61 live vaccine, effectively managing the disease on a domestic scale. However, by the end of 2011, the illness resurged in numerous vaccinated pig farms across China. Research has revealed that the newly prevalent strain exhibits heightened virulence, altered antigenicity, and has diverged into new genetic branches compared to foreign strains and early classic Chinese strains. The inability of existing vaccines to offer complete protection against these new PRV variants presents significant challenges for disease prevention and control. In the face of the emerging epidemic of PRV variants, it is crucial to not only rely on vaccine immunity but also prioritize monitoring of wild viruses. While foreign-developed gE antibody kits have proven effective in detecting wild-type viruses, there remains a discernible gap between domestically and internationally developed kits. Consequently, this study aims to develop a monoclonal antibody with superior blocking performance for use as a detection antibody, alongside the preparation of a PRV weak strain with enhanced safety to serve as a coating antigen. The ultimate objective is to establish a highly specific, sensitive, and safe gE antibody blocking ELISA method.

This study utilized inactivated and purified PRV HeN1 strain whole virus as the immunogen to immunize mice and prepare monoclonal antibodies. A monoclonal antibody cell line against PRV gE protein, named 1C10A4, was successfully generated. The monoclonal antibody (MAB-1C10A4) exhibited good reactivity towards both the PRV classical strain (SC strain) and the PRV variant strain (HeN1 strain). Blocking ELISA results demonstrated that MAB-1C10A4 could be blocked by high-titer PRV serum, and the serum still retained 50% blocking efficacy against the monoclonal antibody at a dilution gradient of 1:3200. Results from B-cell epitope identification revealed that MAB-1C10A4 recognizes a novel antigenic epitope 41PSAEVWD47, and this epitope is highly conserved across different PRV strains. These findings indicate that this study has successfully obtained a specific monoclonal antibody targeting a conserved antigenic epitope. This monoclonal antibody holds potential for development into an effective antibody detection method.

This study furthered its efforts by establishing a blocking ELISA method for detecting gE antibodies using MAB-1C10A4. Firstly, the PRVHeN1 was subcultured in LM-TK<sup>-</sup> cells treated with 5-bromodeoxyuracil nucleoside (BrdU), resulting in the screening of a mutant strain with TK gene deletion named HeN1- $\Delta$ TK-2. This mutant strain, which has lost its pathogenicity in PRV sensitive animal mice, was found to be significantly attenuated compared to its parent strain HeN1, and was utilized for safe antigen encapsulation in the blocking ELISA method. Secondly, the HeN1- $\Delta$ TK-2 strain was inactivated and purified to prepare the coated antigen, which was then combined with MAB-1C10A4 to successfully establish a blocking ELISA for detecting PRV gE antibodies. The study tested 400 known negative and positive clinical serum samples using the optimized method, and the OD<sub>450nm</sub> values were analyzed

using MedCalc v15.8 software for ROC curve and interactive plot analysis. The judgment result of this method was determined: when the S/N value was  $\leq 0.5$ , it was considered positive for gE antibodies, while a value greater than 0.5 was deemed negative for anti-gE antibodies. The sensitivity test results indicated that the gE antibody blocking ELISA method established in this study was 0-2 times more sensitive to PRV-positive serum than commercial reagent kits. Furthermore, specificity tests showed that when detecting specific serum of multiple viruses, only PRV-specific serum test results were positive. Repeatability tests demonstrated that the coefficient of variation for intra- and inter-batch repeatability was less than 5%. In the detection of 492 clinical samples, the compliance rates of this method, IDEXX kit, and domestic kit compared to the IFA were 97.15%, 95.73%, and 81.5%, respectively. Additionally, when detecting the trend of serum antibody changes at different time points after immunization and challenge, the gE antibody detection method developed in this study was consistent with the detection results of IDEXX's kits. Moreover, this method could detect antibody positivity earlier than IDEXX's kits. These results indicate that the gE antibody blocking ELISA method developed in this study can be effectively applied to the detection of PRV wild-type infections, providing essential technical support for the prevention, control, and purification of PRV.

**Keywords:** Pseudorabies Virus, Monoclonal antibody, Antigen epitope, Blocking ELISA

# 目 录

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 第一章 绪论 .....                         | 1  |
| 1.1 PRV 概述 .....                     | 1  |
| 1.2 PRV 的发生及发展史 .....                | 1  |
| 1.3 PRV 变异株的分离、鉴定 .....              | 2  |
| 1.3.1 PRV 变异株抗原性的变异及毒力的增强 .....      | 2  |
| 1.3.2 PRV 变异株遗传进化新特征 .....           | 3  |
| 1.4 PRV 在我国的流行情况 .....               | 4  |
| 1.5 抗 PRV 疫苗的研发 .....                | 5  |
| 1.5.1 抗 PRV 经典株的疫苗 .....             | 5  |
| 1.5.2 抗 PRV 变异株的疫苗 .....             | 6  |
| 1.6 PRV 的诊断技术 .....                  | 7  |
| 1.7 研究目的及意义 .....                    | 8  |
| 第二章 PRV 单克隆抗体的制备及鉴定 .....            | 9  |
| 2.1 材料方法 .....                       | 9  |
| 2.1.1 病毒, 细胞, 质粒与实验动物 .....          | 9  |
| 2.1.2 主要试剂 .....                     | 9  |
| 2.1.3 仪器设备 .....                     | 9  |
| 2.1.4 免疫原的制备 .....                   | 10 |
| 2.1.5 小鼠免疫及免疫效果检测 .....              | 10 |
| 2.1.6 细胞融合 .....                     | 10 |
| 2.1.7 PRV 阳性杂交瘤细胞的筛选、亚克隆及扩大培养 .....  | 11 |
| 2.1.8 抗 PRV-gE 阳性杂交瘤细胞的筛选及扩大培养 ..... | 11 |
| 2.1.9 单克隆抗体特性的鉴定 .....               | 11 |
| 2.1.10 单克隆抗体识别的 B 细胞表位的鉴定 .....      | 12 |
| 2.1.11 抗原表位保守性分析 .....               | 17 |
| 2.2 结果 .....                         | 17 |
| 2.2.1 小鼠免疫效果检测及细胞融合 .....            | 17 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 2.2.2 PRV 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆.....         | 18 |
| 2.2.3 PRV-gE 阳性杂交瘤细胞的筛选.....          | 18 |
| 2.2.4 单克隆抗体特性的鉴定.....                 | 19 |
| 2.2.5 单克隆抗体识别的 B 细胞表位的鉴定.....         | 20 |
| 2.2.6 抗原表位保守性分析.....                  | 22 |
| 2.3 讨论.....                           | 23 |
| 2.4 小结.....                           | 24 |
| 第三章 PRV-gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立.....      | 25 |
| 3.1 材料方法.....                         | 25 |
| 3.1.1 主要试剂.....                       | 25 |
| 3.1.2 仪器设备.....                       | 25 |
| 3.1.3 包被抗原制备.....                     | 25 |
| 3.1.4 腹水的制备、纯化及标记.....                | 26 |
| 3.1.5 gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立及反应条件优化..... | 26 |
| 3.1.6 临界值的确定.....                     | 27 |
| 3.1.7 敏感性试验.....                      | 27 |
| 3.1.8 特异性试验.....                      | 27 |
| 3.1.9 重复性试验.....                      | 27 |
| 3.1.10 临床样品的检测.....                   | 27 |
| 3.1.11 免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势的检测.....    | 27 |
| 3.2 结果.....                           | 27 |
| 3.2.1 包被抗原制备.....                     | 28 |
| 3.2.2 腹水的制备、纯化及标记.....                | 30 |
| 3.2.3 gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立及反应条件优化..... | 30 |
| 3.2.4 临界值的确定.....                     | 31 |
| 3.2.5 敏感性试验.....                      | 32 |
| 3.2.6 特异性试验.....                      | 32 |
| 3.2.7 重复性试验.....                      | 33 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 3.2.8 临床样品的检测 .....                | 33 |
| 3.2.9 免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势的检测 ..... | 34 |
| 3.3 讨论 .....                       | 35 |
| 3.4 小结 .....                       | 37 |
| 第四章 结论 .....                       | 38 |
| 参考文献 .....                         | 39 |
| 致 谢 .....                          | 45 |
| 作者简历 .....                         | 46 |

## 主要符号对照表

| 英文缩写  | 英文全称   | 中文名称                   |
|-------|--|------------------------|
| aa    | Amino acid                                     | 氨基酸                    |
| AD    | Aujeszky's disease                             | 奥耶兹基氏病                 |
| BrdU  | 5-Bromodeoxyuridine                            | 5-溴脱氧尿嘧啶核苷             |
| DIVA  | Differentiate Infected from Vaccinated Animals | 区别感染动物和接种动物            |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay              | 酶联免疫吸附试验               |
| IFA   | Indirect Immunofluorescence Assay              | 间接免疫荧光试验               |
| IPTG  | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside    | 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 |
| MAB   | Monoclonal Antibody                            | 单克隆抗体                  |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction                      | 聚合酶链式反应                |
| PRV   | Pseudorabies Virus                             | 伪狂犬病毒                  |
| SP    | Penicillin-Streptomycin Solution               | 青霉素-链霉素混合液             |
| SDS   | Sodium Dodecyl Sulfate                         | 十二烷基硫酸钠                |
| WB    | Western Blot                                   | 蛋白印迹法                  |

# 第一章 绪论

## 1.1 PRV 概述

伪狂犬病毒 (Pseudorabies Virus, PRV) 是疱疹病毒科、 $\alpha$  疱疹病毒亚科、水痘病毒属的成员, 与其同属的还有 I 型牛疱疹病毒 (Bovine herpesvirus-1, BHV-BHV-1)、马疱疹病毒 (Equine herpes virus, EHV) 以及水痘带状疱疹病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)。PRV 病毒粒子直径约为 225 nm, 基因组为双链 DNA, 长约 145 kb, 可编码 70 多种蛋白质, 被包裹在二十面体衣壳中。被膜是由大约 12 种蛋白质组成的集合, 至少分为两层, 其中一层与包膜蛋白相互作用, 而另一层与衣壳密切相关。包膜是由跨膜蛋白嵌入的脂质双层, 其中的许多蛋白通过糖基化修饰 (GUTEKUNST et al., 1980; METTENLEITER et al., 2009; POMERANZ et al., 2005; KRAMER et al., 2011; YE et al., 2022)。

PRV 可引起各种家畜和野生动物出现发热、奇痒 (猪除外) 及脑脊髓炎等临床症状。猪 (包括野猪) 既是 PRV 的原发感染宿主又是病毒的长期贮存和排出者, 在该病的传播上发挥着极其重要的作用, 且仅在猪中可观察到潜伏感染。病毒经口鼻感染后, 在上呼吸道复制, 然后攻击感觉神经末梢, 穿过突触感染神经元, 侵入神经系统 (NAWYNCK et al., 1995)。不同饲养阶段的猪感染后临床症状不同: 仔猪表现出中枢神经系统紊乱, 致死率高达 100%; 育肥猪伴有呼吸道症状, 死亡率低; 妊娠母猪常发生流产, 产死胎、木乃伊胎; 此外, 任何年龄的猪在耐过 PRV 的急性感染后均能在体内形成潜伏感染, 即该病毒可以在猪体内终生潜伏, 并且不表现任何临床症状, 但当机体受到外界刺激产生应激后, 处于潜伏状态的病毒能够被激活, 导致复发性感染并向外散毒, 这种潜伏-激活循环机制给疫病的防控带来了巨大挑战 (PRIOLA et al., 1990; GUTEKUNST et al., 1980; NIE et al., 2023)。世界动物卫生组织 (WOAH) 将伪狂犬病列为“通报名录疫病” (listed disease), 我国将其列为三类动物疫病。

## 1.2 PRV 的发生及发展史

伪狂犬病的起源可追溯到上世纪初, 在 1902 年, 匈牙利学者 Aujeszky 就对该病进行了报道 (METTENLEITER, 2000), 因此该病又被称为奥耶兹基氏病 (Aujeszky's disease, AD), 该病在被 Aujeszky 报道以前, 由于其临床症状同狂犬病相似, 而被误认为是狂犬病, 也正是两者有着类似的症状, 因此, 后来以“伪狂犬病”命名。1910 年, 德国学者 Schmied hoffer 通过滤菌后获得可传代的致病因子而证实了该病的病原体为病毒 (SEHL et al., 2020)。1931 年, 美国学者 Shope 首次从牛体内分离到该病病毒, 将病毒接种给猪后引起了猪的瘫痪麻痹, 因而发现了猪在传播该病上具有重要作用 (SHOPE, 1931)。1933 年 Traub 首次成功地以细胞培养的方式来繁殖该病毒 (TRAUB, 1933)。自该病被 Aujeszky 报道以来, 其在欧洲的很多地方, 尤其是欧洲的中东部开始呈地方性的流行。在 20 世纪 60 年代末之前, 美国的 PR 被认为是一种散发性疾病, 但从 70 年代以来其发病率一直在稳步上升, 美国农业部在 1974 年记录了 125 例, 1975 年 255 例, 1976 年 714 例, 1977 年 1256 例 (LEE et al., 1979)。此外, 日本在 1981 年也报道了 PR, 直至 1988 年共发现有 59 个阳性猪场 (陈平洁, 2005)。从全世界来看, 70 年代以来, PR 的流行呈现上升趋势, 成为世界性的

动物重要传染病。据不完全统计,至少有 44 个国家和地区都报道发生过本病,其危害仅次于猪瘟和口蹄疫,全世界因该病所造成的经济损失每年高达几十亿美元 (LIU et al., 2022)。

1961 年,匈牙利兽医 Adorján Bartha 通过低温连续传代获得了一种比野毒株毒性小的突变体 (Bartha K61 株),该突变株的致病性因编码某些毒力或免疫逃逸因子的基因 (包含 gE、Us9 基因的全部缺失, gI、Us2 基因的部分缺失) 改变甚至完全缺失而减弱,这是有史以来开发的第一批 PRV 减毒疫苗,它至今仍是各种 PR 根除计划的重要疫苗 (SKODA et al., 1964)。通过接种基因缺失疫苗 (如 Bartha K61 和 BUK 株等),配合对相应缺失基因 (gE) 编码蛋白的抗体检测,欧美一些国家已经完成了对 PRV 的净化 (KIT et al., 1987; MCFERRAN et al., 1975; LIAN et al., 2023)。

我国于 1979 年从匈牙利引进了 Bartha K61 疫苗株,总体上来说,由于 Bartha K61 株疫苗在我国的广泛使用,伪狂犬病在国内得到了有效控制。但 2011 年以来,PRV 变异株在我国暴发并持续流行,时刻威胁着养殖业的发展。

### 1.3 PRV 变异株的分离、鉴定

2011 年下半年以来,我国许多免疫过 PRV 活疫苗 (Bartha K61 株) 的规模化猪场出现了疑似 PR 的疫情,主要表现为母猪流产、产弱仔、死胎,大量新生仔猪出现神经症状和死亡。彭金美等从河南、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等省的 14 个猪场采集了 153 份临床样品,进行了 PRV 强毒的检测及分离鉴定,结果表明,所检测的 14 个猪场均存在 PRV 野毒感染 (彭金美等, 2013)。进一步研究发现,新流行的 PRV 在抗原性上发生了变化,致病力增强,在遗传进化上也出现了新的特征。2012 年至今,国内多家科研机构一直对 PR 疫情进行监测,发现免疫猪场 PRV 流行持续存在,序列分析和动物试验结果均证实 PRV 发生变异 (HE et al., 2019; YU et al., 2014; BO et al., 2021)。

2013 年中国农业科学院哈尔滨兽医研究所率先在国内、国际杂志上发表文章表明 PRV 发生变异,引起了国内、外广泛关注。美国农业部动植物卫生检验局 (USDA APHIS) 和英国农业部动植物卫生署 (APHA) 经我国农业部允许分别于 2015 和 2016 年引进了分离的 PRV HeN1 株,美国农业部研究也证实现有 Bartha K61 株疫苗免疫猪对 PRV HeN1 株的攻击仅能提供部分保护 (PAPAGEORGIU et al., 2022)。

#### 1.3.1 PRV 变异株抗原性的变异及毒力的增强

彭金美、安同庆等于 2012 年首次分离到一株流行毒株 PRV HeN1 株,他们将 PRV HeN1 分离株接种小鼠后,小鼠出现了瘙痒、死亡等伪狂犬病典型临床症状,而且对小鼠的  $LD_{50}$  ( $10^{2.37} TCID_{50}$ ) 显著低于经典强毒 PRV SC 株 ( $10^{3.83} TCID_{50}$ ),这说明 PRV HeN1 株对小鼠的毒力较 PRV SC 株增强;此外,中和试验的结果显示,Bartha K61 活疫苗免疫的猪只仅能诱导对 HeN1 株低水平的中和抗体,而 HeN1 株能够诱导产生较高水平的中和抗体,并具有更强的交叉中和能力 (彭金美等, 2013)。为了进一步地比较 Bartha K61 株疫苗对中国经典毒株 PRV SC 株与新流行毒株 PRV HeN1 株的免疫保护效力,安同庆等以绵羊为动物模型进行攻毒保护试验,结果发现接种 Bartha K61 株活疫苗的绵羊可免受 PRV SC 株的致死性攻击,证明该疫苗免疫原性依然存在且符合质量标准。然而,接种 Bartha K61 株活疫苗的绵羊在 PRV HeN1 株的攻击下仅有 50% 的存活率,这表

明该疫苗不能提供针对新流行毒株的完全保护。据此推测,新流行毒株与传统毒株相比发生了抗原性的变化,所以 Bartha K61 株活疫苗对其的保护相对减弱 (AN et al., 2013)。随后, Yu 等利用新分离 NVDC-PRV-SD 株对免疫传统疫苗 21 d 后的猪进行攻毒试验,结果同样发现,免疫猪未获得完全有效的抗感染保护,并表现出与田间观察到的典型症状相似的明显临床症状,因而推测新分离的 PRV 毒株的毒力发生了变化,且这种毒力可能导致受感染猪的死亡 (YU et al., 2014)。罗玉子等采用绵羊攻毒保护试验模型发现,经典 Bartha K61 疫苗不能完全保护绵羊抵抗新分离毒株 PRV TJ 株的攻击,且与经典毒株 PRV SC 相比,新分离毒株 PRV TJ 株对小鼠和猪具有更强的致病性,这表明 PRV TJ 株的毒力较经典的 PRV SC 株发生了一定的增强 (LUO et al., 2014)。此外,童武等对 2012 年分离到的 PRV-JS-2012 株开展了的有关仔猪致病性的研究显示,仔猪在接种 PRV-JS-2012 株 4 d 后开始出现死亡,病死率达 100% (童武等, 2014)。

总之,对于新流行的 PRV 变异株,抗原性发生了变异,致病力增强,而且面对 PRV 变异株的攻击,现有疫苗无法对免疫猪和羊提供完全的保护。

### 1.3.2 PRV 变异株遗传进化新特征

叶超等 (YE et al., 2015) 将获得的 PRV HeN1 株和 JS 株的全基因组序列与 4 株 PRV 全基因组序列和 729 个部分基因序列进行了比较,结果显示中国分离的 PRV 毒株与欧美的 PRV 毒株相比,序列差异显著。通过系统进化分析,首次将 PRV 分为 2 个不同的类群,中国分离的毒株属于基因 II 型,国外分离株为基因 I 型 (图 1-1)。HeN1 株全基因组测序以及对毒力相关的基因 (TK、PK、RR1、RR2、gE、gI) 和 PRV 感染相关的基因 (gB、gC、gD、gH) 比较分析结果显示,国内分离株之间的序列同源性相对较高 (96.2%~100%),而与国外分离株的同源性相对较低 (92.9%~99.7%);国内分离株与国外分离株在感染和毒力相关编码基因上存在着特征性的氨基酸突变、插入和缺失特征;遗传演化分析表明,国内外分离株间具有显著的遗传差异,处于两个独立的遗传演化分支。此外,国内分离株相较于国外分离株在 gC 蛋白中存在 7 个氨基酸的连续插入 (<sup>63</sup>AAASTPA<sup>69</sup>),该插入特征可以作为鉴别 PRV 国内外病毒株的分子特征 (叶超等, 2015)。在基因 II 型 PRV 中,又形成了两个明显的分支,即 2011 年以前分离到的经典毒株 (如 Ea, Fa 株) 以及 2011 年以后的 PRV 变异株 (HeN1, HLJ8 株等),新流行的毒株在亲缘关系上与基因 I 型毒株,以及中国早期经典毒株均相距较远 (YE et al., 2016)。HE (2019) 在进化动力学,选择和结构生物学的基础上,对 PRV 进行了全面的分析并对 PRV 的系统发育和适应性进化进行了总结,也同样得出了 PRV 可分为 2 个主要分支的结论。他们的研究还发现,进化枝 2.2 (PRV 变异株) 是目前世界上最流行的基因型,且最常参与跨物种传播事件 (包括人类) (HE et al., 2019)。

赵鸿远等 (赵鸿远等, 2014) 将 2011~2014 年分离鉴定的 PRV 毒株与 GenBank 中登录的来源于全国多个省份的 32 个 PRV 株以及 17 个 PRV 经典株的 gE 核苷酸序列进行比对分析后,发现近 3 年分离的 PRV 与之前分离的 PRV HeN1 株的同源性为 97.1%~99.5%,而与 PRV SC 株的同源性为 96.6%~99.1%。以 gE 氨基酸序列建立的遗传演化分析结果显示,2011~2014 年分离的 PRV 形成了一个相对独立于早期经典株的新分支,而且 PRV 变异株均在 gE 蛋白的第 48 位和第 496 位各存在 1 个天冬氨酸的插入,此外,BO (2021) 的研究同样发现这些特异性的氨基酸突变特征 (BO et al., 2021)。随后郭镇洋等对比了国内外早期经典毒株以及 2011~2021 年 NCBI 公布的

gE 蛋白氨基酸序列，并且进一步明确了 PRV 不同基因亚型的分子特征，即基因 II 型 PRV 变异株的特征为：gE 蛋白 aa496“D”或 aa496“D”+aa448“T”；基因 II 型 PRV 经典株的特征为：gE 蛋白 aa496“D”+aa448“V/A”，解决了以往 PRV 经典株与变异株之间区分模糊的问题(郭镇洋 等, 2023)。

新流行的 PRV 变异株在进化上已经逐渐形成了新的分支，距基因 I 型 PRV 以及国内早期经典 PRV 的亲缘关系较远，且 PRV 变异株在分子上出现了新的特征，这也从进化的角度上解释了 Bartha K61 株无法保护免疫动物免受变异株攻击的原因。

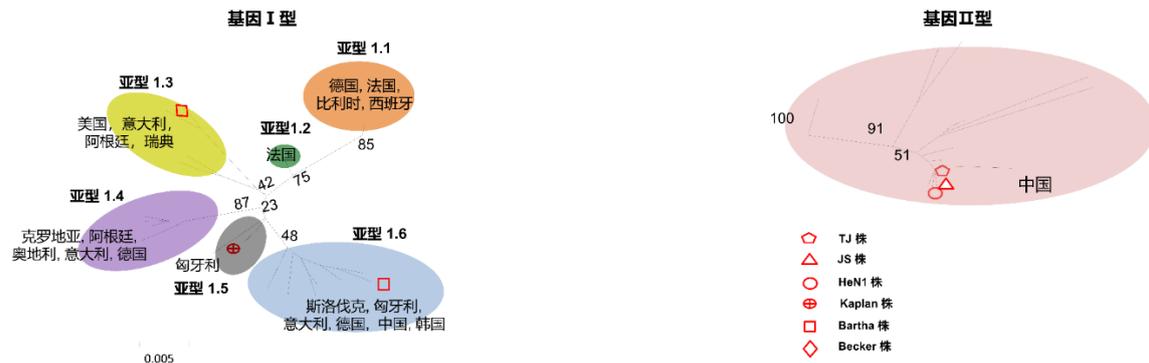


图 1-1: 根据世界各地分离毒株 gC 基因部分序列，在核苷酸水平上构建的系统发育树。阴影区域的大小表示图中所示毒株的数量（引自文献：Ye et al., 2015）。

Fig.1-1 According to the partial sequence of gC gene of strains isolated from all over the world, the phylogenetic tree was constructed at nucleotide level. The size of the shaded area indicates the number of strains represented (reproduced from ref: Ye et al., 2015).

## 1.4 PRV 在我国的流行情况

我国首例伪狂犬病例报告可追溯至 1947 年的家猫感染病例，随后猪、牛、羊、貂、狐等都有相关病例的报道（童光志 等, 1999）。在 20 世纪 60 年代之前，PRV 对动物的损害较小。20 世纪 60 年代以后，由于毒株的毒力不断增强，PRV 引起的临床症状不断增强，不同生长阶段的猪均易感染。自 20 世纪 70 年代开始，PR 在我国的流行范围甚广，已经遍布 23 个省、市、自治区，尤其是伴随着集约化养殖的兴起，虽没有大规模的暴发，但有逐渐扩大和蔓延的趋势，呈散发流行（陈平洁, 2005）。20 世纪 80 年代，随着我国养猪业的不断发展，我国所报道的 PR 病例也不断增多。1987 年，袁庆志等人从发病猪体分离到一株与 Bartha K61 弱毒株的病毒粒子形态、大小和结构一致的毒株，命名为 PRV SC 株（双城株），这是我国首次分离到的猪源性 PRV。PRV SC 株也成为 Bartha K61 株疫苗免疫效果评价的效检用毒株。Bartha K61 株疫苗免疫过的仔猪和绵羊，均能抵抗 PRV SC 株的攻击（袁庆志 等, 1987）。

2011 年底，PRV 变异株开始在我国暴发，在彭金美等（彭金美 等, 2013）报道了 PRV 新流行毒株抗原性发生变异后引起了国内外的广泛关注，这其中有 44 项相关研究分离到了新流行的 PRV 变异株，同时也进行了致病性或遗传进化等分析，这 44 项研究横跨 2011~2022 年，涵盖了 17 个省/市，表明 PRV 变异株的流行速度之快，流行范围之广，且很快取代了我国早期流行的经典毒株（郭镇洋 等, 2023）。直至今日，变异株依然为我国 PRV 流行的主流毒株。

此外，SUN（2018）对收集的 2012 年至 2017 年中国 27 个省份疑似 PRV 感染猪场的样本进

行了 PRV 的核酸检测。在检测的 16256 份样本中, 约 1345 份样本为 PRV gE 阳性, 平均阳性率为 8.27%。2012 年至 2017 年 PRV 的阳性率分别为 11.92% (153/1284)、12.19% (225/1846)、6.70% (169/2523)、11.10% (269/2424)、5.57% (147/2640) 和 6.90% (382/5539)。在区域分布上, 2012 年至 2017 年华东和华中地区 PRV 检测阳性率均高于 10.00%, 而其他地区的阳性率为 7.00%~10.00% (SUN et al., 2018)。TAN (2021) 从中英文数据库中检索了自 2011 年到 2020 年涵盖中国 29 个省份的 108 项代表性的猪群 PRV 血清流行病学研究, 总计 256326 份血清样本, 其中 PRV gE 抗体阳性样本 76553 份, 猪 PRV 感染率平均为 29.87%, 此外, 其还总结了我国不同地区猪群 PRV 野毒感染的血清学流行情况, 有 9 个省/区 PRV gE 抗体阳性率超过 30% (31.03%, 9/29), 华北、华东、中南地区的血清阳性率高于东北、西北、西南地区 (TAN et al., 2021)。

从 2011 年开始有关 PRV 的流行病学调查中, 无论是血清学检测还是抗原检测, 变异株的流行在全国大部分地区均有报道。尽管近几年养猪企业生物安全防护措施在不断增强和升级, 我国自主研发的一系列疫苗也正在投入使用, 但 PRV 的流行却依然在持续, 表明 PRV 对我国养猪业的威胁仍然存在。这也暗示制备针对新流行 PRV 变异株疫苗的步伐仍需加快, 同时相应的鉴别诊断手段也需要加强。

## 1.5 抗 PRV 疫苗的研发

PRV 作为一种威胁养殖业的重大传染病, 在世界范围内的养猪场流行了一百多年。接种疫苗是预防疾病和最大限度地减少 PR 造成经济损失的最有效方法之一 (FREULING et al., 2017)。上世纪 60、70 年代通过细胞传代致弱获得的猪伪狂犬病活疫苗 Bartha K61 株和 BUK 株, 均为包括 gE 基因缺失在内的基因缺失疫苗, 不仅具有良好的安全性和免疫效力, 而且通过检测 gE 抗体可以与野毒感染鉴别诊断, 为伪狂犬病以及其他疾病的防控与净化提供了宝贵的可借鉴的经验。此后, 伪狂犬病疫苗无论是灭活疫苗、弱毒活疫苗还是基因工程疫苗等的研制, 基本均为基因缺失疫苗, 遵循了可区别感染动物和免疫动物的原则 (DIVA), 有利于今后对伪狂犬病的净化。

### 1.5.1 抗 PRV 经典株的疫苗

1979 年, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所从匈牙利引进了猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha K61 株) 种毒, 并对生产工艺进行了改进, 在我国试制成功了伪狂犬病冻干苗。试验证明, 使用的种毒符合毒力标准, 试制的冻干苗, 经实验室和区域试验, 对不同品种的 1~30 日龄仔猪、架子猪、肥猪和妊娠母猪及不同年龄的奶牛、黄牛、水牛和绵羊都安全, 且免疫效力确实。对正在发病的疫点, 用该疫苗对猪或牛进行紧急接种, 疫情能迅速停息。绵羊接种后第 6 d 即可产生坚强的免疫力, 免疫持续至 419 d 仍能全数保护, 第 499 d 免疫率尚在 70% 以上。免疫的妊娠母猪所生的仔猪, 初乳免疫力至出生后三周尚有 85.7% 保护 (袁庆志 等, 1983; 袁庆志 等, 1985; 袁庆志 等, 1986)。该疫苗的试制成功, 填补了我国空白, 达到了国际同类产品的水平, 一经推广应用, 深受用户欢迎, 在实际应用中收到了显著的经济效益。该成果于 1986 年获农业部科技进步二等奖。30 多年来, 猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha K61 株) 广泛应用于规模化猪场, 有效地控制了 PRV 在中国的流行 (SUN et al., 2016)。

上世纪 80 年代初期, 基因工程技术在伪狂犬病疫苗中得到了应用, 即利用基因工程原理和技

术在 PRV 基因组中插入或者缺失一段序列, 导致 PRV 的部分基因不能表达, 从而减弱 PRV 的毒力, 但同时又保持其较强的免疫原性。历史上第一个获得批准使用的基因工程缺失疫苗就是伪狂犬病 TK 缺失疫苗株 BUK-d13, 它是以 PRV BUK 强毒株为原始材料, 通过基因工程方法缺失了 TK 基因的 148 bp 而获得 (KIT et al., 1985)。

进入上世纪 90 年代后, 我国科研工作者也利用基因工程技术开发了基于国内 PRV 分离株为亲本株的疫苗, 如 SA215 株、HB-98 株, HB-2000 株等, 这些疫苗在国内伪狂犬病的防控中均发挥了一定的作用。

SA215 株是郭万柱等以牛源性伪狂犬病病毒 Fa 株为亲本株, 通过同源重组技术缺失了病毒的 TK、gE 和 gI 基因, 同时插入了 LacZ 标签, 获得的三基因缺失病毒, 该疫苗株在 2003 年获得新兽药证书, 是中国第 1 个针对伪狂犬病的转基因疫苗 (METTENLEITER et al., 1994; 徐志文等, 2004)。

HB-98 株是陈焕春等以分离的 PRV Ea 株为亲本株, 通过同源重组技术, 逐步敲除 TK (部分编码区)、gG 基因, 筛选获得的 TK-/gG-/LacZ+ 突变株。“猪伪狂犬活疫苗 HB-98 株”是第 2 个获得国家新兽药证书的猪伪狂犬病基因工程活疫苗 (何启盖等, 2006)。由于 HB-98 株没有缺失 gE 基因, 因此无法利用现有的 gE 抗体检测试剂盒进行鉴别诊断, 陈焕春等又在制备 HB-98 株过程中的中间毒株即 TK 基因缺失株的基础上, 进一步通过同源重组缺失 gE、gI 基因构建了 HB-2000 株 (TK-/gE-/gI-/LacZ+)。试验表明, 该基因缺失疫苗以  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> 和  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 的剂量接种妊娠母猪、新生仔猪及育肥猪均安全, 而且可保护妊娠母猪抵抗  $10^{7.1}$  TCID<sub>50</sub> 强毒的攻击 (刘正飞等, 2004)。2016 年, TK、gI、gE 三基因缺失的猪伪狂犬病耐热保护剂活疫苗 (HB2000 株) 获得了国家三类新兽药证书。

除了利用基因工程方法制备 PRV 基因缺失疫苗以外, 赖志等于 2011 年在中国分离到一株天然包含 gE/gI 缺失的弱毒株 PRV C 株, 在此基础上发展为减毒活疫苗, 并于 2017 年获得新兽药证书 (高俊锋等, 2015)。

### 1.5.2 抗 PRV 变异株的疫苗

2011 年, PRV 变异株在中国暴发, 面对新流行的 PRV 变异株, 市场上应用最为广泛的 Bartha K61 株对免疫猪只并不能提供完全的保护效力。此前我国研发的疫苗均是基于国内早期 PRV 经典毒株为亲本株而研制的疫苗, 尚无直接证据表明这些疫苗对 PRV 变异株的保护作用优于 Bartha K61 疫苗株 (BO et al., 2022; TONG et al., 2015)。因此, 国内多家单位开始研制针对 PRV 变异株的疫苗。

2012 年至今, 已有 4 家单位以 PRV 变异株为亲本毒株研制的灭活疫苗获得了新兽药证书。分别是普莱柯生物工程股份有限公司等研制的猪伪狂犬病灭活疫苗 (HN1201-ΔgE 株, 2019 年) (WANG et al., 2015)、华中农业大学等研制的猪伪狂犬病 gE 基因缺失灭活疫苗 (HNX-12 株, 2021 年) (张明辉等, 2015)、中国农业科学院上海兽医研究所等研制的猪伪狂犬病灭活疫苗 (JS-2012-ΔgE/gI 株, 2022 年) (TONG et al., 2016) 7 以及江苏南农高科技股份有限公司等研制的猪伪狂犬病毒 gE/gI 基因缺失灭活疫苗 (ZJ011G 株, 2023 年) (姜辰龙等, 2022)。这些疫苗毒株都是通过基因工程方法获得, 且都缺失了可用于鉴别检测的 gE 基因。

相较于灭活苗，弱毒活疫苗的研制稍稍滞后，但都取得了较大的进展。

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所借鉴伪狂犬病活疫苗 Bartha K61 株传代致弱的经验，将 2012 年分离的 PRV 变异株 HeN1 株在 Vero 细胞上连续低温传代（温度从 37°C 逐步降低到 28°C）培养，在 F135 代通过噬斑克隆和 gE 基因 PCR 鉴定筛选到一个 gE 阴性的克隆，后经详细鉴定确定其在 US 区存在包括 gI、gE、US9、US2 和部分反向重复序列在内的大片段缺失（缺失长度为 4936 bp）。但将其以  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 的剂量肌注接种绵羊，仍然能使绵羊全部（4/4）发病和死亡。这表明 PRV 变异株的毒力增强，仅缺失 Us 区的 gE 等基因不足以降低其致病性。将该病毒进一步在 LM-TK-细胞上通过 BrdU 进行药物筛选，获得了一株 TK 基因部分缺失的病毒（命名为 PRV TP 株）。将 TP 株以  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> 的剂量肌注接种绵羊，绵羊仍能全部（4/4）健活，这一结果表明 TK 基因才是毒力致弱的关键基因。21 日龄仔猪分别接种 TP 株和 Bartha K61 株后用 PRV HeN1 株攻击，TP 株免疫组猪完全保护（5/5），而 Bartha K61 株免疫组仅有部分保护（4/5），攻毒后两周检测 gE 抗体发现 Bartha K61 组存活的 4 头猪 gE 抗体均阳转，而 TP 株免疫组仅 2 头（2/5）猪 gE 抗体阳转（郭镇洋 等，2023）。上述结果表明 PRV TP 株是一株具有良好的安全性和免疫原性，且易于鉴别诊断的优良候选疫苗株。该疫苗株已于 2024 年获得新兽药证书。

另外，中国农业科学院上海兽医研究所将 2012 年分离的变异株（JS-2012）在 Vero 细胞上高温（40°C）持续传代培养致弱（LIANG et al., 2017）。在传代到 90 代后，病毒毒力明显降低，接种 2 周龄仔猪仅出现轻微发热、食欲减退和精神萎靡，而不会导致死亡；传代到 120 代时接种 2 周龄仔猪已无致病性；从 120 代传代毒中通过噬斑克隆筛选到一株与亲本毒 JS-2012 在 Vero 细胞上病变和噬斑形态明显不同，但繁殖滴度更高的毒株（JS-2012-F120）。通过 PCR 鉴定和测序分析，该毒株在 Us 区缺失 2307 bp，包含部分 gE 基因、Us9 基因和部分 Us2 基因。将该毒株（JS-2012-F120）免疫 2 周龄仔猪后用经典强毒 PRV SC 株和变异株 JS-2012 攻击均能提供完全的保护，且 gE 抗体均未阳转。该毒株目前也处于新兽药注册的复核检验阶段。

## 1.6 PRV 的诊断技术

与常规病毒检测方法类似，针对 PRV 的检测方法主要涉及到病原学检测如病毒的分离鉴定；血清学检测如酶联免疫吸附试验（ELISA）；分子生物学检测如聚合酶链式反应技术（PCR）、荧光定量 PCR。病毒分离和 PCR 检测均适用于病毒感染早期即急性发病期，对于耐过的康复动物或免疫后感染野毒但未表现明显临床症状的动物会发生漏检。病毒分离是传统的疾病诊断方法，对检测实验室条件要求高且花费时间长，而 PCR 作为现代分子生物学技术，具有操作简单、特异性强、灵敏度高等优点，能够在感染早期准确快速的检测病毒核酸。检测抗体的 ELISA 方法，尤其是伪狂犬病在普遍使用 gE 基因缺失疫苗的情况下，检测 gE 抗体更能反映猪群 PRV 的实际感染状况。因此，核酸检测与抗体检测，两者同等重要，缺一不可。

PCR 技术发展到现在已经比较成熟，尤其是对于 PRV，基因组序列相对保守，通过设计特异性的引物、对反应条件适当优化就可以满足常规应用的需求。对 PRV 的核酸检测，主要是检测样品中的 gB 和 gE 基因，通过对 gB 基因的检测，来判定样品中是否含有 PRV；通过对 gE 基因的检测，来判定样品是否感染野生型 PRV（MA et al., 2013），同时，对扩增的 gE 基因进行测序分析也可以了解 PRV 的变异情况。

ELISA 是以抗原抗体的特异性结合为基础建立起的一套特异性检测抗原/抗体的技术。对 PRV 的抗体检测中, 主要涉及 gB、gE 抗体, gB 抗体水平能够反应疫苗的免疫效果, 而 gE 抗体水平则可以确定是否感染野毒。目前, 在国内广泛使用的仍是进口试剂盒, 包括 IDEXX 的 gB、gE 阻断 ELISA 抗体检测试剂盒、百测的 gB、gE 抗体检测试剂盒以及韩国金诺的 gB、gE ELISA 抗体检测试剂盒。我国在 gB 抗体检测试剂盒的开发中也取得一些成果, 如普泰生物的猪伪狂犬病毒 gB 竞争 ELISA 抗体检测试剂盒(批准文号: 163698860)、科前生物的猪伪狂犬病毒 gB 蛋白阻断 ELISA 抗体检测试剂盒(批准文号: 170048928)等均已获新兽药证书并在国内市场流通, 此外, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所联合哈尔滨国生生物已成功开发了猪伪狂犬病 gB 阻断 ELISA 抗体检测试剂盒, 其敏感性比 IDEXX 试剂盒敏感性高 2~8 倍, 目前该试剂盒正在注册申报阶段(赵静, 2021)。总之, 在 gB 抗体检测上, 我国基本可以摆脱进口产品的束缚。但在 gE 抗体检测试剂盒的开发上, 我国仍稍有欠缺。一方面, 由于 gE 蛋白在 PRV 病毒中丰富度可能相对较低(GRUNEWALD et al., 2003); 另一方面, 无论是原核还是真核表达蛋白都不容易维持蛋白的天然结构(NOSAKI et al., 2021; POPA et al., 2016; GUO et al., 2023), 且 gE 蛋白糖基化修饰较多, 因此免疫小鼠制备单克隆抗体难度较大。国内已经获得新兽药证书的 gE 抗体检测试剂盒有科前生物的猪伪狂犬病毒 gE 蛋白 ELISA 抗体检测试剂盒(批准文号: 170048112)和普泰生物的猪伪狂犬病毒 gE 蛋白阻断 ELISA 抗体检测试剂盒(批准文号: 163698926)。

猪伪狂犬病的防控与净化是一个综合性的措施, 疫苗免疫和鉴别诊断是其中的重要一环。我国针对新流行毒株的 gE 基因缺失疫苗和 gB、gE 抗体检测试剂盒的研制均取得了突破性进展, 这将有助于我国对猪伪狂犬病进行有效的防控, 并最终达到净化的目的。

## 1.7 研究目的及意义

PR 发现至今, 已有 100 多年的历史。近几十年来, 随着不断出现的各种防控措施和全国性根除计划的实施, 很多国家已经完成了 PR 在家猪中的净化。我国由于养殖规模较大且目前经济发展水平的限制不足以进行大规模的扑杀和淘汰, 因此加强疫苗免疫和流行病学监测显得尤为重要。2011 年以来, 我国有 29 个省份出现了 PRV 变异株, 呈普遍流行, 造成了重大的经济损失。面对新流行的 PRV 变异株, 除了疫苗免疫以外, 对于野毒的监测也是必不可少的。尽管国外研制的 gE 抗体试剂盒可以很好的用于检测野毒, 但截至目前为止国内开发的此类试剂盒与国外相比仍存在一定的差距, 因此本研究的目的在于制备一株阻断性能良好的单抗作为检测抗体, 同时制备出一株安全性更高的 PRV 弱毒株来作为包被抗原, 最终建立特异性强、灵敏度高且安全性良好的 gE 抗体阻断 ELISA 方法, 为 PRV 的流行病学调查及防控提供技术支撑。

## 第二章 PRV 单克隆抗体的制备及鉴定

单克隆抗体作为一种常用的诊断试剂,备受研究人员青睐。在 PRV 的抗体检测中, gB 和 gE 抗体的检测能够反应动物的免疫状况和鉴定野毒感染,获得一株 gB 和 gE 蛋白相应的单克隆抗体在发展阻断或竞争 ELISA 中至关重要。目前,国内对于 gB 单抗的制备以及抗体检测试剂盒的开发已经达到甚至超过进口产品的水平,然而 gE 蛋白的单克隆抗体的制备相对滞后,且相应的检测方法与进口产品存在极大差距。因此,本研究主要目标是获得一株 gE 蛋白的单克隆抗体,进一步发展抗体检测方法。由于 gE 蛋白为跨膜蛋白,且糖基化修饰复杂,因此在表达以及纯化中存在众多挑战,而全病毒作为一种良好的免疫原性物质,既能保持蛋白的天然构象有易于纯化,因此在单克隆抗体的制备中应用广泛,但由于其免疫后产生的抗体众多,因此在后期对特定单抗的筛选繁杂。

本研究以 PRV 变异株(HeN1 株)全病毒为免疫原免疫小鼠制备单克隆抗体,同时构建了表达 gE 蛋白的重组质粒,利用 IFA 来筛选 gE 蛋白的单克隆抗体,解决了全病毒作为免疫原在筛选单抗过程中的问题。

### 2.1 材料方法

#### 2.1.1 病毒,细胞,质粒与实验动物

PRV HeN1、Bartha-k61、SC 株由本实验室(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所猪病综合防控创新团队)提供;骨髓瘤细胞 SP/20、Marc-145 细胞、人胚胎肾细胞-293T、LM-TK 细胞保存于本实验室;大肠杆菌 BL21(DE3)感受态购买于维地生物公司;含 GST 标签的 PGEX-6P-1 载体由本实验室保存;表达完整 PRV gE 蛋白的真核质粒(PCAGGS-gE)由本实验室构建并保存;6~8 周龄的 SPF 级 BALB/C 小鼠购买于北京维通利华实验动物生物技术有限公司,动物试验于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的动物生物安全二级设施内完成(批准文号:SYXK(Hei)2011022)。

#### 2.1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、OPTI 培养基、50×HAT 培养基添加剂、50×HT 培养基添加剂、FITC-山羊抗小鼠 IgG、胎牛血清、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、50% (v/v) 聚乙二醇(PEG)购买于 SIGMA 公司;酶标板购自 Costar 公司;Hybridoma feeder 添加因子和单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购买于北京博奥龙免疫技术有限公司;HRP-山羊抗小鼠 IgG 购买于中杉金桥生物技术有限公司;同源重组试剂购买于腾源恒峰生物科技有限公司;酶标板购买于 Costar 公司; $\beta$ -丙内酯病毒灭活剂购买于 Wako 公司;青链霉素混合液(SP)购买于哈尔滨兽医研究所诊断与技术服务中心;引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

#### 2.1.3 仪器设备

倒置荧光显微镜(EVOS M5000)、流式细胞分选系统(SONY-MA900)、近红外荧光扫描成像系统(Odyssey CLX)、超速离心机(OptimaXPN-100, BeckmanCoulter)由哈尔滨兽医研究所

中心仪器室提供；生物安全柜（Forma-scientific）、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（Forma-scientific）、酶标仪（TECAN）、分光光度计（NanoDrop-2000, Thermo）、SDS-PAGE 电泳仪及半干转印槽转膜仪（Bio-Red）、离心机（Effendorf）由本实验室提供。

#### 2.1.4 免疫原的制备

Marc-145 细胞在含 10%胎牛血清及 1% SP 的 DMEM 细胞培养基中培养，当细胞在 T75 细胞培养瓶中长至单层密度后，接种 PRV HeN1 株（MOI=0.1），而后置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，每天观察病变，待 90%以上细胞发生明显病变后，将细胞培养瓶放置-80°C冰箱反复冻融 2~3 次，使细胞完全裂解，随后收集病毒液于 4°C 5000 r/min 离心 30 min，收集上清，以 1:2000 的比例加入灭活剂 β-丙内酯并置于 4°C冰箱作用 12 h，在此期间，每隔 4 h 混匀，使病毒得到充分的灭活，完成灭活处理后，将病毒液置于 37°C水浴中 30 min，从而使灭活剂失效，之后将病毒液于 4°C 20000 r/min 离心 3 h，收集沉淀并用无菌 PBS 重悬，利用分光光度计测定蛋白浓度后置于-80°C保存。

#### 2.1.5 小鼠免疫及免疫效果检测

SPF 级 6~8 周龄的 BALB/C 小鼠作为免疫对象，需完成至少 3 次常规免疫和一次加强免疫，具体过程如下：第一次免疫，取制备的免疫原（70~100 μg/只）并用无菌 PBS 稀释（100 μL/只），随后加入等体积的弗氏完全佐剂混匀，利用高通量组织研磨仪震荡 30 min 完成乳化过程，乳化后将离心管内的抗原瞬时离心，吸取 10 μL 加于水面，30 min 内泡沫不散去表示乳化成功，反之则需继续增加乳化时间，完成乳化后用 1 mL 注射器吸取免疫原并采用背部皮下多位点注射方式免疫小鼠。在第 2、3 次免疫中除了将弗氏完全佐剂更换为弗氏不完全佐剂，其它操作均与第一次免疫相同，每一次免疫间隔两周。在融合前第 3 d，需对目标小鼠进行加强免疫，即用不含佐剂的免疫原（70~100 μg/只）对小鼠进行腹腔注射完成加强免疫。

在第 3 次免疫两周后，利用间接 ELISA 方法检测小鼠抗体效价，简而言之，以灭活的 PRV HeN1 株全病毒作为包被抗原，用碳酸盐缓冲液（pH=9.6）包被 96 孔酶标板（1000 ng/孔），100 μL/孔，4°C过夜；弃掉包被抗原并用 PBST 洗板 4 次，拍干；以 1% BSA 为封闭液，200 μL/孔，37°C，封闭 3 h；弃掉封闭液并用 PBST 洗板 4 次，拍干；将小鼠血清进行梯度稀释（1:200~1:204800），每个梯度取 100 μL 加入酶标板，37°C孵育 30 min；弃掉待检样品并用 PBST 洗板 4 次，拍干；加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG（1:5000，100 μL/孔），37°C孵育 30 min；弃掉酶标二抗并用 PBST 洗板 4 次，拍干；加入 TMB 显色液（100 μL/孔），37°C孵育 15 min，随后立即终止反应（2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，50 μL/孔），最后读取 OD<sub>450 nm</sub> 值。

#### 2.1.6 细胞融合

选取 3 次免疫后抗体效价最高的小鼠进行加强免疫，并在 3 d 后进行细胞融合试验，具体操作如下：将小鼠实施安乐死，无菌分离脾脏、提取脾细胞，并完成细胞计数；将提前培育好的 SP/20 细胞从细胞培养瓶中吹下富集，并完成细胞计数；按照脾细胞：SP/20 为 5:1~10:1 的比例将两者混合于 50 mL 离心管，1000 r/min 室温离心 5 min；弃掉上清后轻拍沉淀，使两种细胞充分混合，

随后在 37°C 水浴中完成细胞融合，即向两种细胞混合沉淀中加入 1 mL PEG（1 min 加完），静置 1.5 min，最后缓慢的加入 20 mL DMEM（4 min 加完）终止反应，800 r/min 室温离心 5 min，弃上清，用配制好的 HAT 培养基（含 20%胎牛血清、1%SP）将细胞轻轻悬起并转至 96 孔细胞培养板（200  $\mu$ L/孔），37°C CO<sub>2</sub> 培养箱培养；3 d 后观察是否有存活细胞，如果有则说明融合成功；7~10 d 后可以进行阳性杂交瘤细胞的筛选。

### 2.1.7 PRV 阳性杂交瘤细胞的筛选、亚克隆及扩大培养

以 2.1.5 中的间接 ELISA 方法初步筛选 PRV 阳性杂交瘤细胞，并改用 HT 培养基（含 20%胎牛血清、1% SP）将阳性细胞孔扩大至 24 孔细胞培养板，利用间接 ELISA 复检，对复检阳性的细胞孔扩大至 6 孔细胞培养板，继续利用间接 ELISA 复检，将最终检测仍为阳性的细胞孔用 1 mL DMEM 吹下，取 600  $\mu$ L 转入流式细胞管，利用流式细胞分选系统分选单个细胞于 96 孔细胞培养板，置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 温箱培养，随后，逐步扩大培养，如此便可获得单个克隆的细胞株。

### 2.1.8 抗 PRV-gE 阳性杂交瘤细胞的筛选及扩大培养

将包含完整 PRV gE 蛋白的真核质粒 PCAGGS-gE 转染 293T 细胞，利用间接免疫荧光试验（IFA）检测抗 PRV gE 阳性杂交瘤细胞，具体操作如下：293T 细胞在 12 孔细胞培养板上长成单层后更换为无血清 DMEM 培养基，OPTI 培养基、质粒和转染试剂（PEI）按比例混合（200 mL:1  $\mu$ g:3  $\mu$ L），室温作用 30 min 后加入细胞培养板，37°C 孵育 36 h，弃掉上清，用预冷的无水乙醇（800  $\mu$ L/孔）于 4°C 固定细胞 1 h，PBS 缓慢洗三遍；加入单克隆抗体上清（300  $\mu$ L/孔），37°C 孵育 30 min，弃掉上清，PBS 洗 3 次，加入 FITC-山羊抗小鼠 IgG（300  $\mu$ L/孔，1:200），37°C 孵育 30 min，PBS 洗 3 次后加入 DAPI 核染（300  $\mu$ L/孔），室温避光孵育 2 min，PBS 洗 3 次后每孔加入 500  $\mu$ L PBS 覆盖，最后通过倒置荧光显微镜观察荧光。对抗 PRV gE 阳性杂交瘤细胞扩大培养，分批冻存，最后液氮保存。间隔 1~2 个月对冻存细胞进行复苏，观察是否仍分泌抗体。

### 2.1.9 单克隆抗体特性的鉴定

首先将不同的 PRV 毒株（HeN1、SC）接种于 Marc-145 细胞，在细胞水平上检测单克隆抗体与不同毒株的反应性，具体而言，将 Marc-145 细胞在 6 孔细胞培养板上培养至单层状态，将不同 PRV 毒株以 MOI=0.1 接种于每个细胞孔，待 60%左右的细胞发生细胞病变效应（CPE）后，弃掉上清培养液，用预冷的无水乙醇于 4°C 固定细胞 1 h，PBS 洗 3 次后加入单克隆抗体上清（500  $\mu$ L/孔），37°C 孵育 30 min，弃掉上清，PBS 洗 3 次，加入 FITC-山羊抗小鼠 IgG（500  $\mu$ L/孔，1:200），37°C 孵育 30 min，PBS 洗 3 次后加入 DAPI 核染（500  $\mu$ L/孔），室温避光孵育 2 min，PBS 洗 3 次后每孔加入 1 mL PBS 覆盖，最后通过倒置荧光显微镜观察荧光。

其次，检测单克隆抗体是否能被 PRV 阳性猪血清阻断，具体而言，在 2.1.5 中间接 ELISA 的基础上，将高免血清梯度稀释（1:100~1:12800），每个稀释度取 100  $\mu$ L 加入酶标板，以阴性猪血清作为阴性对照，37°C 孵育 30 min，弃掉待检样品并用 PBST 洗板 4 次，拍干；加入单克隆抗体上清（100  $\mu$ L/孔），37°C 孵育 30 min；弃掉上清并用 PBST 洗板 4 次，拍干；加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG（1:5000，100  $\mu$ L/孔），37°C 孵育 30 min；弃掉二抗并用 PBST 洗板 4 次，拍干；加入

TMB 显色液 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 随后立即终止反应 (2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 最后读取 OD450 nm 值并计算抑制率, 抑制率= (阴性对照-样品)/阴性对照。

最后, 利用商业化的抗体亚型鉴定试剂盒鉴定单克隆抗体的亚型。

#### 2.1.10 单克隆抗体识别的 B 细胞表位的鉴定

首先, 确定单克隆抗体识别的 B 细胞表位为线性表位或是构象表位, 即利用变性处理的 PRV HeN1 全病毒进行 Western Blot (WB) 分析, 具体操作如下: 取超离纯化后的 PRV HeN1 全病毒 200  $\mu\text{L}$ , 加入 5 $\times$ SDS (十二烷基硫酸钠) 50  $\mu\text{L}$ , 混匀后置于沸水煮 15 min, 冷却至室温后, 10000 r/min 离心 2 min; 将蛋白胶置于电泳槽注满电泳液, 在蛋白胶样孔中依次加入蛋白 Marker、变性处理的 PRV HeN1 全病毒, 电压调 80 V 电泳 30 min, 后改为 120 V 电泳 1 h; 剪取合适大小的硝酸纤维素膜 (NC) 并用甲醇激活 15 s, 同时将转印垫置于转膜液中浸泡湿润, 取出蛋白凝胶并将其贴合与 NC 膜的凹面, 后用两个转膜垫将其固定于中间, 放于半干转印槽转膜仪 (Bio-Red), 电压 15 V, 1 h 后完成转膜; 转膜完成后取出 NC 膜置于含 5% 脱脂乳的 PBST 室温封闭 2 h, PBST 溶液室温洗膜 3 次, 每次 10 min; 以单克隆抗体上清作为一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, PBST 溶液室温洗膜 3 次, 每次 10 min; 以 DyLightTM800 抗鼠 IgG (1:10000) 为二抗, 室温避光孵育 1 h, PBST 溶液室温避光洗膜 3 次, 每次 10 min; 最后使用近红外荧光扫描成像系统 (Odyssey CLX) 扫描结果。

其次, 确定单克隆抗体识别线性 B 细胞表位后需进一步鉴定单克隆抗体所识别的最短抗原表位。本研究采用的策略是将 PRV 的 gE 蛋白进行分步的截短, 以此来逐步确定单克隆抗体所识别的最短抗原表位, 具体方案如下:

根据 PGEX-6P-1 载体 (含 GST 标签) 上的酶切位点选择了两种内切酶 (*EcoRI*、*XhoI*) (图 2-1), 将载体线性化处理, 酶切体系见 (表 2-1), 将混合后的酶切体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 将酶切处理后的线性化载体进行核酸电泳, 切取含目的片段的胶块并通过胶回收试剂盒回收, 回收产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。



图 2-1 PGEX-6P-1 载体及相应酶切位点示意图

Fig. 2-1 Schematic diagram of PGEX-6P-1 carrier and corresponding enzyme cleavage sites

表 2-1 载体线性化的双酶切体系

Table 2-1 Dual enzyme digestion system with carrier linearization

| 组分                   | 体积         |
|----------------------|------------|
| PGEX-6P-1 载体         | 2 $\mu$ L  |
| <i>EcoRI</i>         | 1 $\mu$ L  |
| <i>XhoI</i>          | 1 $\mu$ L  |
| 10 $\times$ H Buffer | 5 $\mu$ L  |
| dd H <sub>2</sub> O  | 41 $\mu$ L |

将 PRV gE 蛋白全长截短为 3 个相互重叠的肽段，引物设计参考毒株为 PRV HeN1 株，同时根据载体的酶切位点添加 15 bp 的同源臂，利用设计好的引物以 PRV HeN1 株全基因组为模板进行 PCR，PCR 扩增体系见（表 2-2），PCR 程序为 95  $^{\circ}$ C 5 min；94  $^{\circ}$ C 30 s、63  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 0.5/1 min，30 个循环；72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增出的目的片段同样经过切胶以及胶回收处理，回收产物于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

表 2-2 PCR 反应体系

Table 2-2 PCR reaction system

| 组分                   | 体积          |
|----------------------|-------------|
| 上游引物                 | 2 $\mu$ L   |
| 下游引物                 | 2 $\mu$ L   |
| dNTP                 | 3 $\mu$ L   |
| La Taq 酶             | 0.6 $\mu$ L |
| 2 $\times$ GC Buffer | 15 $\mu$ L  |
| dd H <sub>2</sub> O  | 5.4 $\mu$ L |
| DNA                  | 2 $\mu$ L   |

将酶切后的线性化载体与目的片段的回收产物混合并配合同源重组酶（腾源恒峰生物公司），在 37  $^{\circ}$ C 水浴进行同源重组 30 min，体系见（表 2-3）。完成同源重组后，将重组后产物全部转化入大肠杆菌 DE3 感受态，待菌落长成后挑取 10 个单菌落，加入含氨苄抗性（A<sup>+</sup>）LB 液态培养基，37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床过夜培养。取 2 mL 菌液送测序公司测序（睿博兴科生物技术有限公司），利用 SnapGene 软件分析测序结果是否正确，对测序结果正确的样品按照千分之一的比例扩大培养，37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床过夜培养，而后取 100  $\mu$ L 扩大后的菌液加入 10 mL 含 A<sup>+</sup>的 LB 液态培养基，37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床 2~3 h，利用分光光度计检测 OD<sub>600 nm</sub> 值，待 OD<sub>600 nm</sub> 在 0.4~0.6 范围内时向菌液中加入 10  $\mu$ L 诱导剂（IPTG），37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床 5~7 h 后完成诱导（该过程中以转化 PGEX-6P-1 空载体的组分为对照组），将菌液 1000 r/min 离心 1 min，富集至 2 mL 离心管，加入 200  $\mu$ L 的 PBS 将沉淀重悬，加入 50  $\mu$ L 5 $\times$ SDS 沸水煮 15 min，冷却至室温后，10000 r/min 离心 2 min。对样品进行 WB 分析，其中，一抗分别为抗 GST 标签抗体（1:15000 稀释）和单克隆抗体上清，前者的意义在于确定目的肽段是否正常表达，后者则在于确定与单克隆抗体反应的特异性肽段。

通过上一轮的鉴定，单克隆抗体识别抗原表位的范围被缩小，接下来，根据上一阶段的检测

结果继续将与单克隆抗体反应的肽段进一步截短，如此反复，直至确定单克隆抗体识别的最短抗原表位。分步截短表达肽段所需的引物如下(表 2-4)，其中引物 gE121F/gE121R、gE122F/gE122R、AF/AR、A1F/A1R、A2F/A2R、A3F/A3R、A4F/A4R、S1F/S1R、S2F/S2R、S3F/S3R 为互补的两条序列，直接通过高温退火完成配对。

表 2-3 同源重组体系

Table 2-3 Homologous recombination system

| 组分   | 体积         |
|------|------------|
| 酶切载体 | 5 $\mu$ L  |
| 目的片段 | 5 $\mu$ L  |
| 酶    | 10 $\mu$ L |

表 2-4 抗原表位鉴定所需引物

Table 2-4 Primers required for antigen epitope identification

| 引物名称   | 序列 (5'-3')  |
|--------|---|
| gE1F   | <b>GGATCCCCGGAATTCATGCGGCCCTTTCTG</b>   |
| gE1R   | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGTCGTGCAGCGTGTA</b>  |
| gE2F   | <b>GGATCCCCGGAATTCGACTACCTGCCGCCGA</b>  |
| gE2R   | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGGCCGTACGGGTTCCAC</b>                                      |
| gE3F   | <b>GGATCCCCGGAATTCGACTACACGCTCGTCGC</b>   |
| gE3R   | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAAGCGGGGCGGGCATTCA</b>                                      |
| gE1-1F | <b>GGATCCCCGGAATTCATGCGGCCCTTTCTG</b>   |
| gE1-1R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGACCTCGGTGACGGG</b>  |
| gE1-2F | <b>GGATCCCCGGAATTCACCCCGGGCCCCGTC</b>   |
| gE1-2R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGCCGTTGAGGTCATC</b>  |
| gE1-3F | <b>GGATCCCCGGAATTCGACGATGACCTCAAC</b>   |
| gE1-3R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGTTCACCAGATGGGC</b>  |
| gE1-4F | <b>GGATCCCCGGAATTCACCCCGGGCCCCATCTG</b>   |
| gE1-4R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTACCAGATCCCGGCCAG</b>  |
| gE1-5F | <b>GGATCCCCGGAATTCGACGGCGCCGTGCTG</b>   |
| gE1-5R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTACTCGGGGACGCAGGC</b>  |
| gE1-6F | <b>GGATCCCCGGAATTCCTGGGCCGCGCCTGC</b>   |
| gE1-6R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGTCGTGCAGCGTGTA</b>  |
| gE121F | <b>CGAGGTCCCGAGTCCCTCGGCCGAGGTCTGGG</b><br><b>ACGACCTCTCCTAATCGAGCGGCCGCATC</b> |

续表 2-4

|        |  |
|--------|--|
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGGAGAGGTCGTCCC</b>                           |
| gE121R | AGACCTCGGCCGAGGGACTCGGGACCTCGGTG<br>ACGGGGCCCGGGGTGAATTCGGGGATCC |
|        | <b>GGATCCCCGGAATCCCCCTCGGCCGAGGTCTGG</b>                         |
| gE122F | GACGACCTCTCCACCGAGGCCGACGACGATGA<br>CCTCAACGGCTAATCGAGCGGCCGCATC |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGCCGTTGAGGTCATC</b>                          |
| gE122R | GTCGTCGGCCTCGGTGGAGAGGTCGTCCCAGA<br>CCTCGGCCGAGGGGAATTCGGGGATCC  |
|        | <b>GGATCCCCGGAATCCCCCTCGGCCGAGGTCTG</b>                          |
| AF     | GGACGACCTCTCCTAATCGAGCGGCCGCATC                                  |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGGAGAGGTCGTCCC</b>                           |
| AR     | AGACCTCGGCCGAGGGGAATTCGGGGATCC                                   |
|        | <b>GGATCCCCGGAATTCGCCGAGGTCTGGGACGA</b>                          |
| A1F    | CCTCTCCTAATCGAGCGGCCGCATC  |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGGAGAGGTCGTCCC</b>                           |
| A1R    | AGACCTCGGCGAATTCGGGGATCC   |
|        | <b>GGATCCCCGGAATTCGTCTGGGACGACCTCTC</b>                          |
| A2F    | CCTAATCGAGCGGCCGCATC   |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGGAGAGGTCGTCCC</b>                           |
| A2R    | AGACGAATTCGGGGATCC   |
|        | <b>GGATCCCCGGAATCCCCCTCGGCCGAGGTCTG</b>                          |
| A3F    | GGACGACTAATCGAGCGGCCGCATC  |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGTCGTCCCAGACCT</b>                           |
| A3R    | CGGCCGAGGGGAATTCGGGGATCC   |
|        | <b>GGATCCCCGGAATCCCCCTCGGCCGAGGTCTG</b>                          |
| A4F    | GTAATCGAGCGGCCGCATC  |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTACCAGACCTCGGCCG</b>                           |
| A4R    | AGGGGAATTCGGGGATCC   |
|        | <b>GGATCCCCGGAATTCCTCGGCCGAGGTCTGGGA</b>                         |
| S1F    | CGACTAATCGAGCGGCCGCATC   |
|        | <b>GATGCGCCGCTCGATTAGTCGTCCCAGACCT</b>                           |
| S1R    | CGGCCGAGAATTCGGGGATCC  |
|        | <b>GGATCCCCGGAATCCCCCTCGGCCGAGGTCTG</b>                          |
| S2F    | GACTAATCGAGCGGCCGCATC  |

续表 2-4

|     |  |
|-----|--|
| S2R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTAGTCCCAGACCTCGG</b>  |
|     | <b>CCGAGGGGAATTCCGGGGATCC</b>            |
| S3F | <b>GGATCCCCGGAATCCCCTCGGCCGAGGTCTGG</b>  |
|     | <b>TAATCGAGCGGCCGCATC</b>                |
| S3R | <b>GATGCGGCCGCTCGATTACCAGACCTCGGCCGA</b> |
|     | <b>GGGGAATTCCGGGGATCC</b>                |

注：黑色加粗序列为载体部分同源臂

### 2.1.11 抗原表位保守性分析

确定单克隆抗体识别的抗原表位后，以 NCBI 中公布的国内外 PRV 毒株的 gE 基因序列为参考，利用 MegAlign 软件分析抗原表位的保守性。

## 2.2 结果

### 2.2.1 小鼠免疫效果检测及细胞融合

小鼠完成 3 次普通免疫后的第 14 d，尾静脉采血，分离血清，以 PBS 为稀释液做倍比稀释（100~102400），按照上述建立的间接 ELISA 方法检测血清抗体效价。结果显示，3 次免疫后小鼠血清抗体效价均在 1:102400 以上（图 2-2），抗体水平较高，达到细胞融合条件。随后，对小鼠进行加强免疫，并在 3 d 后进行细胞融合，在融合后 6~8 d 观察融合后杂交瘤细胞长势（图 4）。

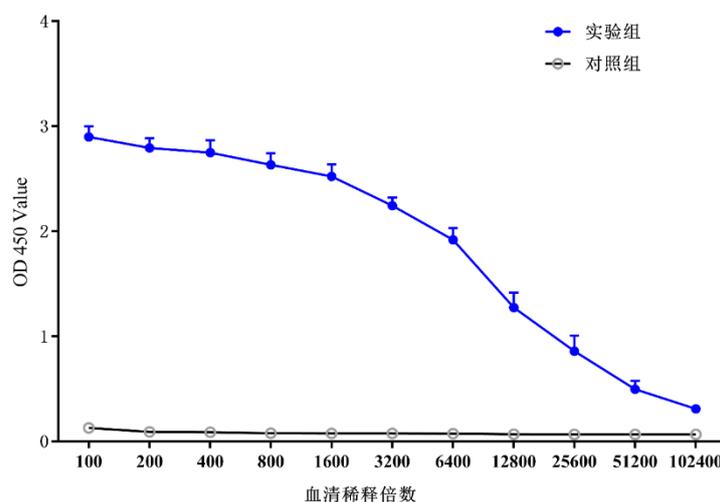


图 2-2 小鼠血清抗体效价检测

Fig 2-2 Mouse serum antibody titer detection

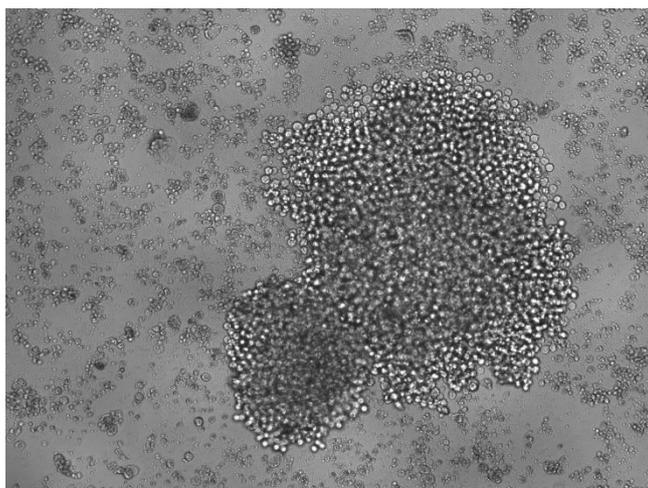


图 2-3 融合后产生的杂交瘤细胞团

Fig 2-3 Hybridoma cell clusters produced after cell fusion

### 2.2.2 PRV 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

融合后细胞培养至 7~10 d 开始检测阳性杂交瘤细胞，利用间接 ELISA 对培养孔内上清进行检测。结果显示，有 5 个细胞孔内上清为阳性（表 2-5）。将这 5 个阳性孔继续扩大至 6 孔板培养，待细胞密度生长至 80%左右，利用流式分选系统将其分选为单个细胞于 96 孔细胞培养板，培养 10 d 后，利用间接 ELISA 对这些单个细胞进行检测，结果显示最原始的 5 个阳性孔中，仅有 1C10A4（OD<sub>450 nm</sub>=1.47）与 4F5（OD<sub>450 nm</sub>=2.27）仍可以检测到抗体的分泌，对这两株单克隆抗体继续利用流式分选系统进行亚克隆纯化，重复纯化 3 次后，这两株单克隆抗体均可以正常分泌抗体，这表明，本次融合成功获得了两株抗 PRV 的单克隆抗体，分别命名为 MAB-1C10A4、MAB-4F5。

表 2-5 阳性杂交瘤的初筛结果

Table 2-5 Preliminary screening results of positive hybridomas

| 编号     | OD <sub>450 nm</sub> |
|--------|----------------------|
| 1C10A4 | 1.32                 |
| 1F6    | 1.48                 |
| 4D1    | 0.97                 |
| 4E11   | 1.13                 |
| 4F5    | 2.15                 |

### 2.2.3 PRV-gE 阳性杂交瘤细胞的筛选

为了确定以上获得的单克隆抗体是否为抗 gE 蛋白的单克隆抗体，本研究将表达 gE 蛋白的真核质粒（PCAGGS-gE）转染于 293T 细胞，然后对单克隆抗体上清进行 IFA 检测。结果显示，MAB-1C10A4 能够与转染 PCAGGS-gE 质粒的细胞反应，而 MAB-4F5 则不能（图 2-4），这表明，

MAB-1C10A4 分泌抗 gE 蛋白的抗体，MAB-4F5 则需要进一步的验证。

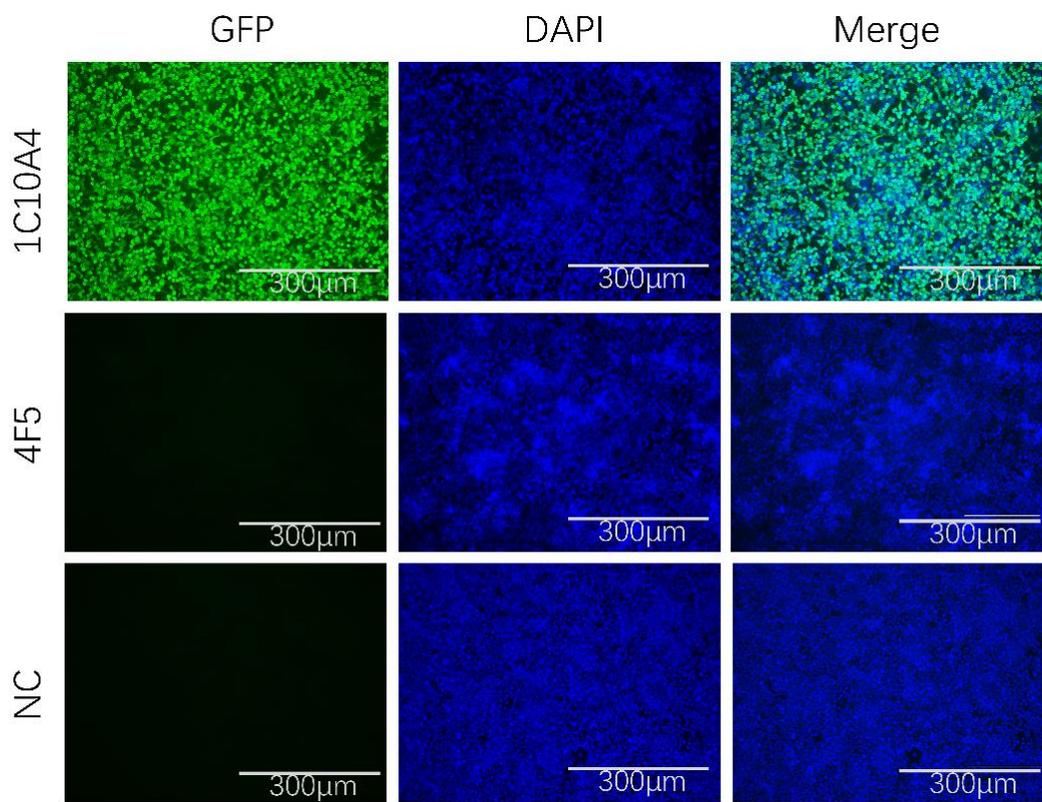


图 2-4 IFA 鉴定单克隆抗体的靶标蛋白

Fig 2-4 Identification of target proteins of monoclonal antibodies through IFA

#### 2.2.4 单克隆抗体特性的鉴定

为了确定 MAB-1C10A4 是否能够与不同的 PRV 株反应，本研究将 PRV HeN1 株（变异株）和 SC 株（经典株）分别感染 Marc-145 细胞，然后对单克隆抗体上清进行 IFA 检测。结果显示，MAB-1C10A4 能够与以上两种 PRV 反应并表现出明显的荧光（图 2-5），表明 MAB-1C10A4 与经典和变异的 PRV 株均具有良好的反应性。

为了确定 MAB-1C10A4 能否被阳性猪血清阻断，本研究以初步建立的阻断 ELISA 方法检测了不同稀释度的 PRV 高免血清对 MAB-1C10A4 的阻断效果。结果显示，3200 倍稀释的高免血清对 MAB-1C10A4 仍有约 50% 的阻断效果（图 2-6），这表明该单克隆抗体能够有效的被 PRV 阳性血清阻断，具有开发阻断 ELISA 的潜力。

最后，使用商业化的亚型分类试剂盒检测抗体亚型，结果表明 MAB-1C10A4 属于 IgG2a 亚类。

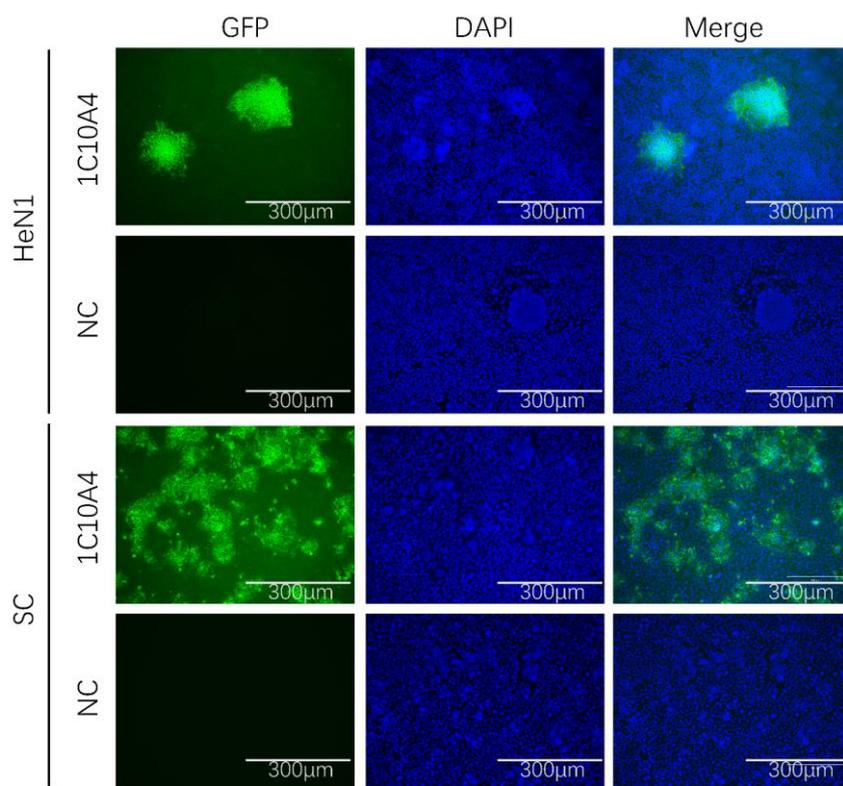


图 2-5 MAB-1C10A4 与不同 PRV 毒株的反应性

Fig 2-5 The reactivity of MAB-1C10A4 with different PRV strains

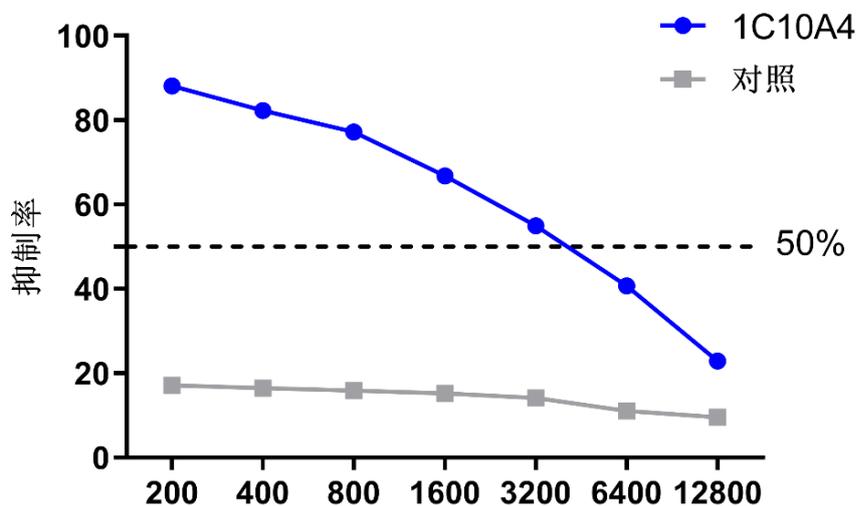


图 2-6 不同稀释度的 PRV 高免疫血清阻断 MAB-1C10A4 与病毒的结合效果

Fig 2-6 Blocking effect of PRV high immune serum with different dilutions on the binding of MAB-1C10A4 to the virus

### 2.2.5 单克隆抗体识别的 B 细胞表位的鉴定

为了确定 MAB-1C10A4 识别的抗原表位, 本研究将 PRV gE 蛋白逐步截短为重叠的多肽(图 2-7)。然后通过 Western Blot 测试这些多肽与 MAB-1C10A4 的反应性, PGEX-6P-1 载体中的 GST 标签作为验证每个截短肽是否成功表达的依据。最终的实验结果显示: 首先, MAB-1C10A4 能够与 PRV HeN1 株的全病毒反应, 且在 100~130 KD 处有明显条带(条带大小与 gE 蛋白相符); 其次, MAB-1C10A4 与 PGEX-6P-1 空载体没有反应活性, 另外, 每个截短肽均被成功表达; 最后, 确定 MAB-1C10A4 识别的最短表位位于 aa41~aa47, 即 <sup>41</sup>PSAEVWD<sup>47</sup> (图 2-8)。

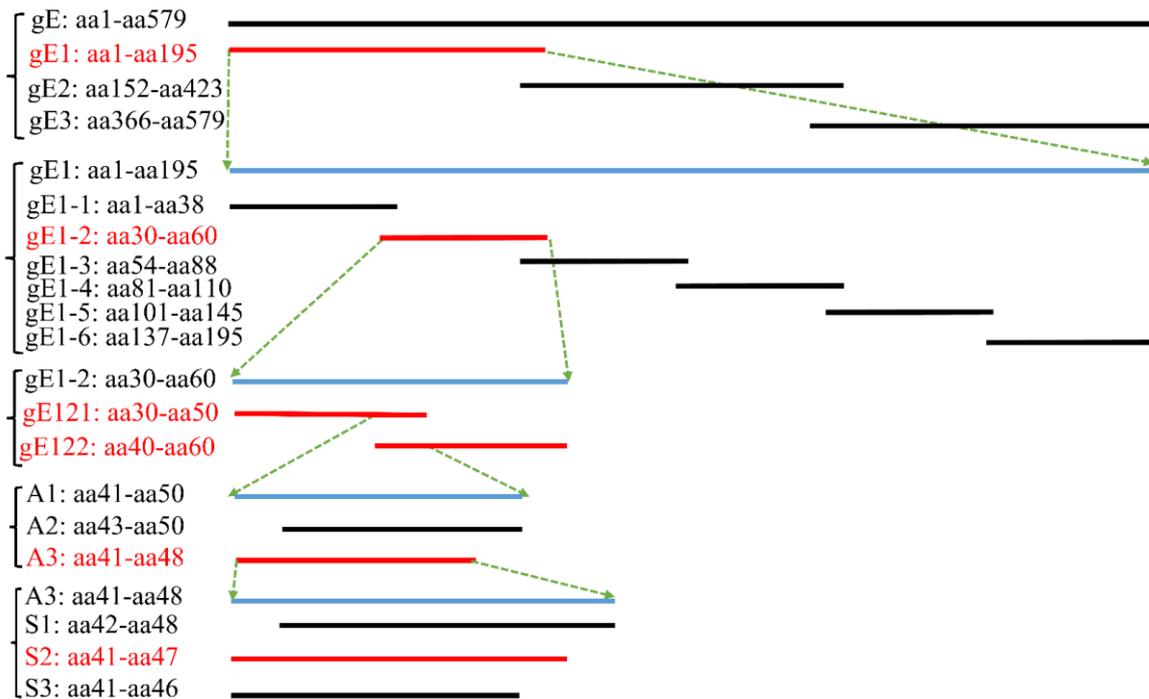


图 2-7 抗原表位鉴定示意图

红色实线表示每个截短的蛋白质中可以与单克隆抗体反应的肽段, 蓝色实线表示红色实线按比例放大的状态。

Fig 2-7 Schematic diagram of antigen epitope identification

The red solid line represents the peptide that can react with the monoclonal antibody in each truncated protein, and the blue solid line is the state of the red solid line that is enlarged in proportion to the ratio.

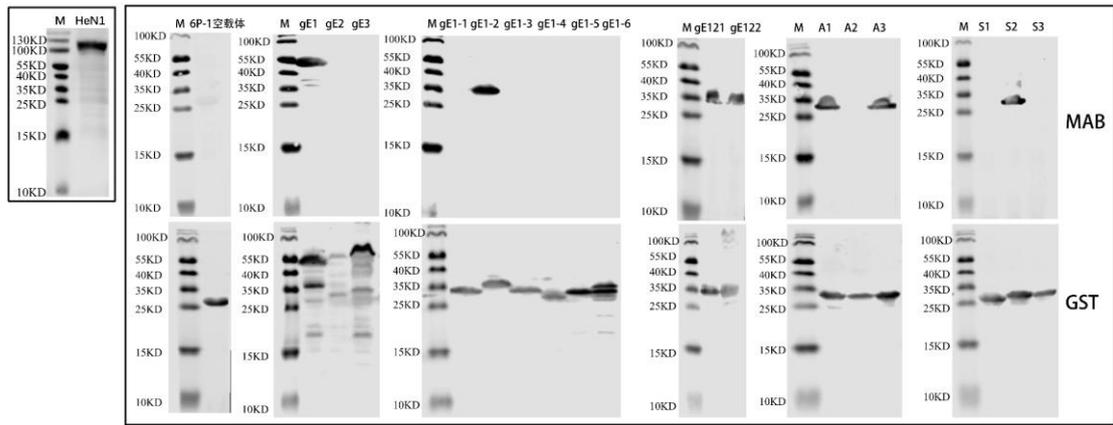


图 2-8 WB 鉴定病毒以及不同截短后的融合蛋白与 MAB-1C10A4 的反应性

Fig 2-8 WB identification of the reactivity of MAB-1C10A4 with viruses and different truncated fusion proteins

### 2.2.6 抗原表位保守性分析

为了评估 MAB-1C10A4 识别抗原表位的保守性，本研究从 NCBI 收集了不同类型 PRV gE 蛋白的氨基酸序列。然后通过 MegAlign 软件分析表位的保守性。结果表明，I 型和 II 型 PRV 在 aa41~aa47 位具有高度的保守性（图 2-9）。

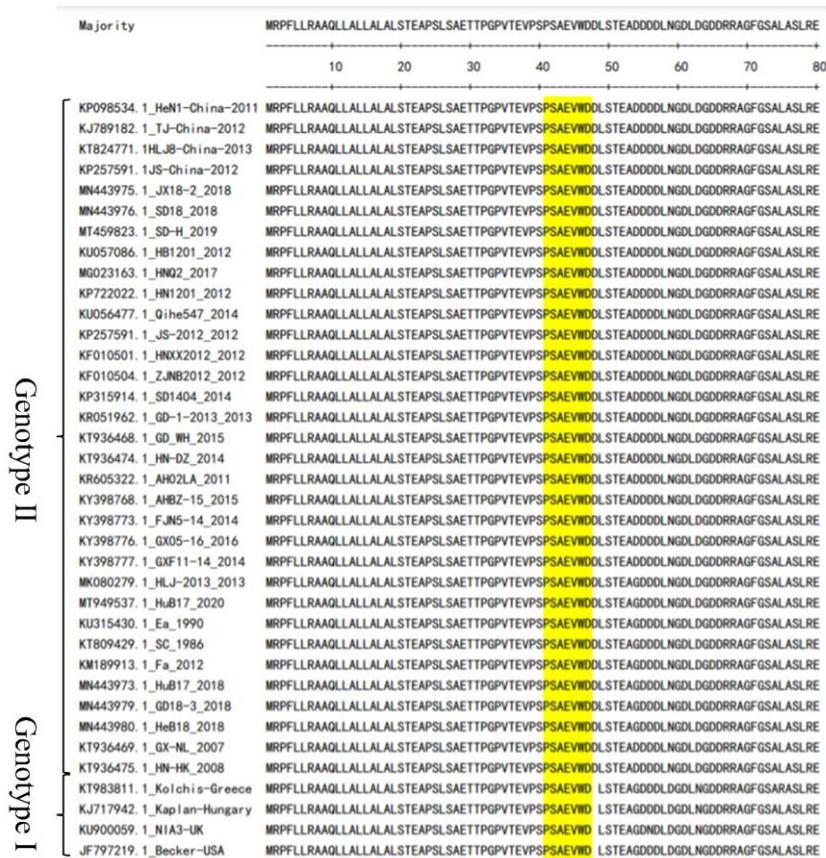


图 2-9 抗原表位的保守性分析

Fig 2-9 Conservative analysis of antigen epitopes

## 2.3 讨论

本研究以 PRV 变异株 (HeN1 株) 全病毒为免疫原免疫小鼠制备单克隆抗体, 获得了一株针对 PRV gE 蛋白的特异性单克隆抗体。IFA 结果显示, 该单克隆抗体能够与 PRV 经典株 (SC 株) 和变异株 (HeN1 株) 反应, 表明该单克隆抗体对不同的 PRV 毒株具有广谱性, 同时, B 细胞抗原表位鉴定结果也证实了该单克隆抗体识别的是一个保守的表位; 进一步的研究发现, 该单克隆抗体能够有效的被 PRV 感染的阳性血清阻断, 表明其有开发为抗体检测方法的潜力。

在单克隆抗体的制备过程中, 重组表达蛋白作为代表性的免疫原而备受研究者青睐。然而, 无论是真核还是原核蛋白表达系统中, 获得具有天然结构的蛋白质是具有挑战性的 (GARVEY, 2022), 很难模拟免疫应答期间天然蛋白质呈递的过程。PRV 的各种囊膜蛋白具有广泛的糖基化修饰 (MULDER et al., 1997), 这对蛋白表达造成了重大困难。在最初的阶段, 本实验室通过原核表达系统生产重组 gE 蛋白, 以此为免疫原制备单克隆抗体, 然而, 我们的研究发现, 这些单克隆抗体不能被阳性猪血清有效阻断, 使得它们不适合开发相应的试剂盒 (吴桐 等, 2017)。真核表达系统产生的蛋白质虽然具有较为完整的生物活性, 但表达水平太低 (POPA et al., 2016), 这意味着如果用真核系统来源的蛋白质作为包被抗原来开发抗体检测方法, 成本太高。此外, 由于 PRV gE 蛋白属于跨膜蛋白, 因此很难将完整的 gE 蛋白表达并纯化, 大部分研究人员则是通过表达 gE 蛋白的部分抗原区来作为免疫原 (XU et al., 2019; ZHANG et al., 2019), 这就引起了一个新的问题, 即截短的重组蛋白严重影响了完整蛋白的天然结构。本实验室曾做过一项研究 (未发表), 即构建了包含 gE 蛋白的胞外区的真核质粒并利用 293T 细胞表达重组蛋白, 然而得到的重组蛋白的分子量远远小于预期的大小, 因此推测 gE 蛋白的胞内区对蛋白的构象以及其它的一些修饰至关重要。在仔细考虑优缺点后, 本研究最终决定使用 PRV 变异株的全病毒作为免疫原, 作出这一选择有几个原因: 第一, 它确保了蛋白质的天然构象; 第二, 它最可能获得与 PRV 变异株感染后产生的抗体表型非常相似的单克隆抗体; 第三, 全病毒可以满足快速、大量的制备。

单克隆抗体及其识别的抗原表位是研究 PRV 蛋白结构和功能的重要工具。它们能够分析抗原表位特征, 帮助设计抗病毒药物, 促进疫苗开发, 并帮助建立抗体检测方法。截至目前为止报告的 gE 蛋白的主要表位包括  $^{148}\text{EM}(\text{R})\text{GIGDY}^{154}$  (XU et al., 2019)、 $^{161}\text{RLRRE}^{165}$  (XU et al., 2019)、 $^{151}\text{IGDY}^{155}$  (吴桐 等, 2017) 和  $^{67}\text{RRAG}^{70}$  (GUO et al., 2023)。然而, 本研究揭示了一个新的且在不同 PRV 毒株中均保守的表位 ( $^{41}\text{PSAEVWD}^{47}$ ), 这是以前没有报道过的, 结合其他研究数据发现, 目前所鉴定的 gE 蛋白的抗原表位主要位于 C-末端的 200 个氨基酸内。因此, 该特定区域极有可能代表 gE 蛋白的主要抗原区。此外, MAB-1C10A4 可被 PRV 阳性猪血清有效阻断。这一发现表明 MAB-1C10A4 识别的表位可能是 gE 蛋白中抗原优势区。

## 2.4 小结

1. 制备了一株针对 PRV gE 蛋白的单克隆抗体 1C10A4，该单抗与 PRV 经典株和变异株均具有良好反应性，且能够被 PRV 阳性猪血清阻断。
2. 鉴定了一个新的、保守的 PRV gE 蛋白的抗原表位 <sup>41</sup>PSAEVWD<sup>47</sup>。

## 第三章 PRV-gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立

阻断 ELISA 抗体检测方法常用的包被抗原为表达的重组蛋白或是全病毒，表达的重组蛋白作为包被抗原最显著的优势则是制备过程不涉及活病原，安全性高而且易于定量，但是重组蛋白的构象难以复刻蛋白质的天然结构，对于 gE 蛋白而言，无论是真核还是原核表达系统都难以表达出完整的蛋白，倘若仅选取主要抗原区进行表达，则会影响蛋白的构象，尤其是糖基化的修饰，最终可能会导致在检测的过程发生一些非特异性的结合或者假阴性等现象；全病毒作为包被抗原则可以避免以上缺点，其不仅保持了蛋白的天然结构，而且易于大量制备和纯化，然而对于 PRV 而言其强毒株对多种动物均可造成致死性伤害，甚至是人类都存在感染风险，因此其在繁殖过程中的安全性问题不容忽视。

为了解决全病毒在作为包被抗原制备过程中的安全性问题，本研究利用药物抑制的方法处理 PRV 强毒 HeN1 株，目的在于获取一株毒力极大减弱的弱毒株，以其作为包被抗原来提高其在生产中的安全性问题，同时结合前期制备的 gE 单克隆抗体建立高效、灵敏的阻断 ELISA 方法。

### 3.1 材料方法

#### 3.1.1 主要试剂

TMB 显色液购自湖州英创公司；BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；ELISA 包被板购自 Costar 公司；Protein G 抗体纯化介质购自金斯瑞生物科技有限公司；伪狂犬病毒 gE 抗体检测试剂盒 (IDEXX) 购自北京爱德士元亨生物科技有限公司；5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 购自 SIGMA 公司。

#### 3.1.2 仪器设备

同 2.1.3。

#### 3.1.3 包被抗原制备

由于活病毒在大量制备过程中仍存在各种风险，考虑到后续生产的安全性问题，本研究对包被抗原进行了优化，主要是通过药物筛选的方法获得 TK 基因缺失的减毒 PRV，以其代替强毒作为包被抗原，进而提高在生产和使用过程中的安全性，具体操作过程如下：

使用添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 LM-TK 细胞，48 h 左右生长状态良好的 LM-TK 细胞按照 1:3 的比例传代至 6 孔板，每孔 2 mL (一般为 3 个孔，一个添加药物，另外两个不添加药物)，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 36~48 h 后弃掉孔中液体，换为无血清 DMEM 并向其中加入终浓度为 40 mg/L 的 BrdU，继续在细胞培养箱培养 10 h，之后按 0.1% 的比例向加药孔和其中 1 个未加药孔中接种病毒，另 1 个未加药孔做对照，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养，每天观察细胞病变，病变明显时收毒 (2~3 d)，冻存于 -80 °C。将收获的加药孔病毒液继续传代，重复上述步骤，药物筛选 4~7 轮后进行噬斑克隆，将每一轮收获的病毒液按 1:10 稀释，用 0.45 μm 小滤器过滤 (去掉细胞碎片和杂质，尽可能使形成的噬斑为单个病毒感染所致)，而后再 10 倍梯度稀释 (1:10<sup>2.0</sup>、1:10<sup>3.0</sup>、1:10<sup>4.0</sup>、

1:10<sup>5.0</sup>), 每个稀释度取 1 mL 接种于状态良好的 Vero-E6 细胞, 37 °C 感作 1 h 后, 吸出病毒液, DMEM 洗 1 遍后, 用含 1% 中性红的低熔点琼脂糖固定 (2 mL/孔), 室温下凝固后, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养, 每天观察细胞病变, 病变明显时用枪头从稀释度最大的孔中挑取单个噬斑, 将噬斑浸入 0.5 mL DMEM 中, 吹打后接种铺满 24 孔板的 Vero 细胞, 病变明显后收毒, 提取基因组, PCR 鉴定 TK 基因, 引物设计参照 (彭金美 等, 2009)。经过 3 代左右的噬斑筛选完成 TK-突变体的纯化。

对纯化后的 TK-突变体扩大培养, 而后用 DMEM 进行 10 倍系列稀释, 取 10<sup>-5.0</sup>、10<sup>-6.0</sup>、10<sup>-7.0</sup>、10<sup>-8.0</sup>、10<sup>-9.0</sup> 5 个稀释度, 分别接种 96 孔细胞培养板上上生长良好的 Vero 细胞, 每个稀释度接种 8 孔, 0.1 mL/孔, 同时设正常细胞对照, 置 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养并观察 7 日, 按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。最后对小鼠进行致病性研究。涉及小鼠的实验方案得到了哈尔滨兽医研究所动物福利委员会的批准, 所有实验都在生物安全二级实验室进行, 有严格的生物安全措施。将 35 只 SPF 级 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 7 组, 每组 5 只。将 PRV HeN1 和 TK-病毒液按照 10<sup>8.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL、10<sup>7.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL、10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 的梯度分别接种于 BALB/C 小鼠 (滴鼻, 10 μL/只) 另外设对照组 5 只小鼠接种等量的 DMEM, 在整个实验过程中记录所有小鼠的临床体征。在 TK-株安全性检验完成后按照 2.1.4 中方法制备包被抗原。

### 3.1.4 腹水的制备、纯化及标记

首先, 给 Balb/c 小鼠注射未乳化的弗氏不完全佐剂 (300 μL/只), 一周后将分泌 gE 抗体的杂交瘤细胞 (1C10A4) 注射 Balb/c 小鼠 (细胞量为 1×10<sup>6.0</sup>~3×10<sup>6.0</sup> 个/只), 7 d 后开始每日观察小鼠腹部, 待小鼠腹部明显鼓起后, 采集小鼠腹水。采集的腹水 8000 r/min、4 °C 离心 5 min, 吸取上清, 利用 Protein G 抗体纯化介质进行纯化, 而后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 鉴定其中是否含有杂质。纯化后抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记由南京金斯瑞公司完成, 标记后的单克隆抗体于 -80 °C 保存。

### 3.1.5 gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立及反应条件优化

方阵法确定抗原和酶标单克隆抗体最佳使用浓度: 将纯化的病毒用碳酸盐缓冲液 (pH=9.6) 按 1:200~1:1200 的比例进行系列稀释后, 加入到 96 孔 ELISA 包被板孔中, 100 μL/孔, 4°C 过夜; 洗涤液洗涤 3 次, 拍干, 每孔加入 200 μL 1% BSA、37°C 封闭 1.5 h, 洗涤 3 次, 拍干; 用 PBS 将 PRV 阴、阳性标准血清 1:2 稀释后加入到各孔中, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 0.5 h, 洗涤 3 次, 拍干; HRP 标记的 gE 单克隆抗体 (HRP-1C10A4) 按 1:1000~1:8000 的比例稀释后加入到各孔中, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 0.5 h, 洗涤 3 次, 拍干; 加入底物显色液 TMB, 100 μL/孔, 37 °C 避光孵育 15 min, 每孔加入 50 μL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应; 测定 OD<sub>450 nm</sub> 值, 计算 N/P 值=阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> 值/阳性血清 OD<sub>450 nm</sub> 值, N/P 值最大的反应孔对应的包被抗原和酶标单克隆抗体稀释度即是最佳使用浓度。

确定包被抗原和酶标单克隆抗体的最佳使用浓度后, 进一步利用方阵法对封闭时间 (1 h、1.5 h、2 h)、被检血清作用时间 (10 min、20 min、30 min)、底物显色时间 (5 min、10 min、15 min) 等条件进行优化。

### 3.1.6 临界值的确定

400 份已知阴阳性的临床猪血清，按照优化的阻断 ELISA 方法检测，测定 OD<sub>450 nm</sub>，计算 S/N 值（被检样品 OD<sub>450 nm</sub> 值/阴性对照 OD<sub>450 nm</sub> 值），用 MedCalc v15.8 软件进行 ROC 曲线和交互式点图分析，确定临界值。

### 3.1.7 敏感性试验

标记为 1~5 号的血清来自感染不同 PRV 毒株的仔猪。具体来说，1 号和 2 号是 PRV SC 株攻毒后收集的血清，3 号、4 号和 5 号是 PRV HeN1 株攻毒后获得的血清。5 份血清样品按梯度稀释（1:2~1:2048），用优化的阻断 ELISA 进行检测。根据临界值判定阳性和阴性结果，并与商用试剂盒（IDEXX）的检测结果进行比较，评价该方法的灵敏度。

### 3.1.8 特异性试验

按照优化的阻断 ELISA 方法对猪伪狂犬病病毒（PRV）、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、非洲猪瘟病毒（ASFV）、猪瘟病毒（CSFV）、猪流行性腹泻病毒（PEDV）、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）、猪圆环病毒（PCV）的特异性血清进行检测，根据临界值判定阴阳性，评估本方法的特异性。

### 3.1.9 重复性试验

包被 3 批次 ELISA 板，从每批次板中随机各取 3 块板，按照优化的反应条件，对 5 份血清进行检测，对结果进行统计学分析，评估本方法的批内及批间重复性。

### 3.1.10 临床样品的检测

首先，用 IFA 对中国多个猪场的 492 份临床血清进行检测。随后，用本实验室研制的 gE 抗体阻断 ELISA 和商品试剂盒（IDEXX）以及国产试剂盒对这些血清进行检测。最后，将这三种方法与 IFA 试验结果进行比较，以评价其一致性。

### 3.1.11 免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势的检测

免疫攻毒后的动物血清由本实验室保存。将 10 头 21 日龄 PRV 抗原、抗体阴性仔猪随机分为 2 组，免疫-攻毒组（I）用 PRV TP 株减毒活疫苗（肌肉注射， $1 \times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/头）免疫仔猪，14 d 后用 PRV HeN1 株（滴鼻， $1 \times 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头）攻击；攻毒对照组（II），仔猪注射生理盐水代替疫苗，其他条件与免疫-攻毒组相同。实验动物分别于免疫前、免疫后 7 d、免疫后 14 d、攻毒后 7 d、攻毒后 14 d 采集血样，分离血液和血清后，用优化好的 gE 抗体阻断 ELISA 检测不同时间点的血清抗体水平。为了进行比较，使用商业化 gE 抗体检测试剂盒（IDEXX）作为对照。

## 3.2 结果

### 3.2.1 包被抗原制备

将 PRV HeN1 株在经 BrdU 处理过的 LM-TK-细胞上连续传代，病变明显时收毒（图 3-1），对 F4 代病毒进行噬斑克隆，随机挑取四个噬斑扩大培养后，PCR 检测 TK 基因，结果显示，所有条带大小肉眼观察并无明显差异（图 3-2），随机挑选两个噬斑测序，结果显示，这两个噬斑的 TK 基因相较于亲本毒 HeN1 株以及其它 PRV 株均在相同的位置存在 2 个碱基的缺失（图 3-3），该突变导致 TK 基因发生移码，从而不能形成完整的开放阅读框。将该突变株经过 3 轮的噬斑纯化扩大培养并命名为 HeN1- $\Delta$ TK-2 株。

按 Reed-Muench 法计算 HeN1- $\Delta$ TK-2 株的效价为  $10^{8.71}$  TCID<sub>50</sub>/mL。将不同稀释度的病毒液接种 BALB/C 小鼠，其中接种 HeN1- $\Delta$ TK-2 株的三组小鼠在攻毒后 3 周均存活且无任何临床症状，而接种 HeN1 株的三组小鼠均出现了典型的 PR 症状：发病鼠撕咬接种部位，导致局部被毛脱落、皮肤出血、严重者后肢被咬断，这些小鼠在接种后 3 d 内全部死亡（图 3-4）。以上结果表明，本研究制备的 PRV TK 基因缺失突变株（HeN1- $\Delta$ TK-2 株）在小鼠上具有很好的安全性。最后，按照 2.1.4 中方法制备包被抗原。HeN1- $\Delta$ TK-2 株病毒经超离纯化后，用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度为 4.3 mg/mL。

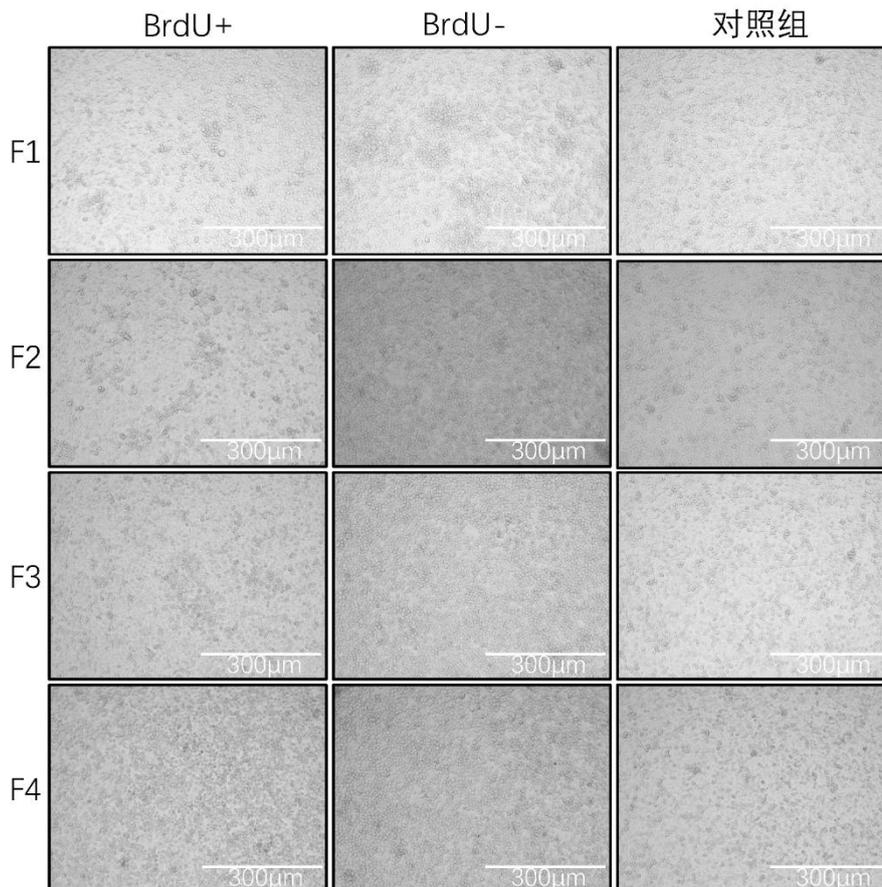


图 3-1 PRV HeN1 株在 LM-TK-细胞上的传代培养

Fig 3-1 Passage culture of PRV HeN1 strain on LM-TK cells

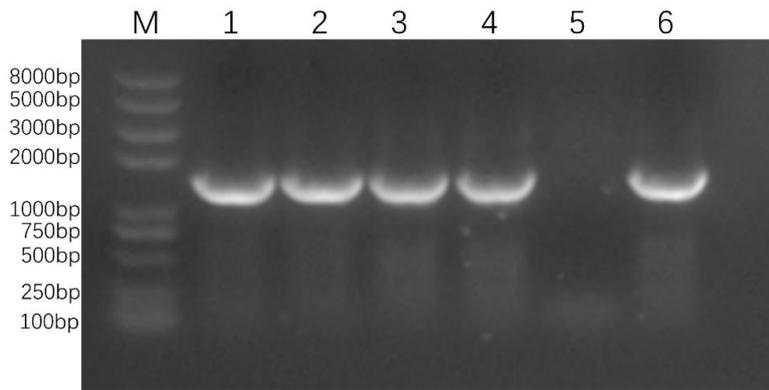


图 3-2 F4 代病毒单克隆噬斑的 PCR 鉴定

泳道 1~4 为随机挑选的四个噬斑, 5 为阴性对照, 6 为阳性对照。

Fig 3-2 PCR identification of monoclonal plaques of F4 generation virus

1~4 were randomly selected plaques, 5 were negative controls and 6 were positive controls.

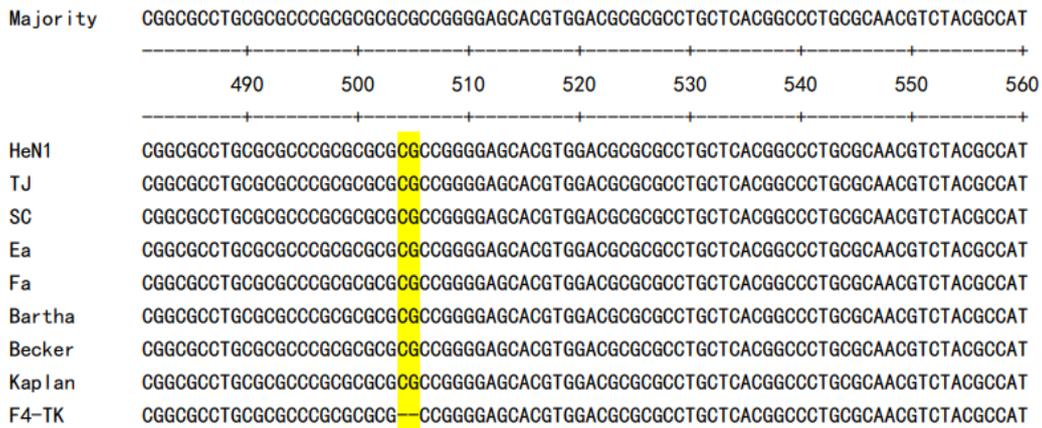


图 3-3 单克隆噬斑的 TK 基因比对

Fig 3-3 Comparison of TK genes in monoclonal plaques

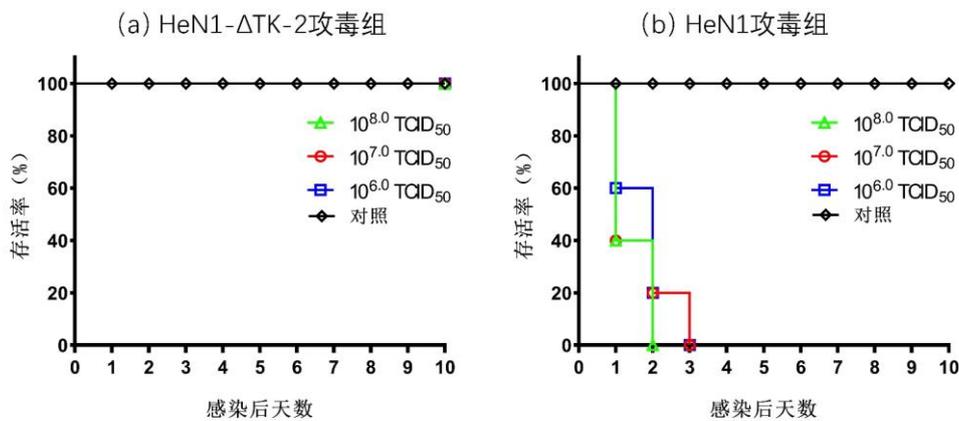


图 3-4 不同剂量的 PRV HeN1 株与 HeN1-ΔTK-2 株攻毒后小鼠的生存曲线

Fig 3-4 Survival curves of mice infected with PRV HeN1 and HeN1-ΔTK-2 strains at different doses

### 3.2.2 腹水的制备、纯化及标记

通过给小鼠注射 MAB-1C10A4 杂交瘤细胞制备腹水，对获得的腹水进行离心处理，进一步利用 Protein G 抗体纯化介质进行纯化，不同批次的腹水纯化结果通过 SDS-PAGE 鉴定。结果显示，MAB-1C10A4 单克隆抗体重链和轻链清晰，无杂带，表明纯化成功（图 3-5），纯化后腹水经 BCA 蛋白浓度定量试剂盒测定，浓度为 0.978 mg/mL，纯化后腹水的辣根过氧化物酶（HRP）标记由南京金斯瑞公司完成，标记后腹水浓度为 1.359 mg/mL。

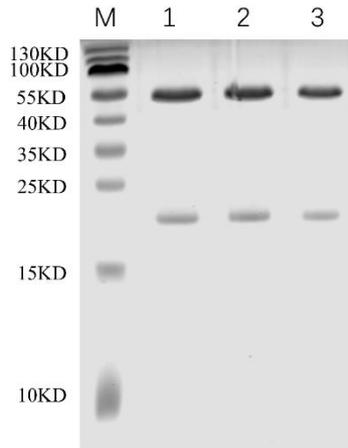


图 3-5 不同批次的腹水纯化结果

泳道 1~3 分别是三个批次的腹水纯化结果

Fig 3-5 Purification results of ascites from different batches

1~3 are the purification results of ascites from three batches respectively.

### 3.2.3 gE 抗体阻断 ELISA 方法的建立及反应条件优化

经过一系列方阵滴定试验，最终确定了 gE 抗体阻断 ELISA 最佳的反应条件（表 3-1），阻断 ELISA 反应示意图如下（图 3-6）。

表 3-1 阻断 ELISA 检测方法的最佳反应条件

Table 3-1 The optimized conditions of blocking ELISA

|       | 包被条件                    | 封闭条件                      | 待检样品                      | 酶标抗体                      | 显色底物                       |
|-------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 最佳稀释度 | 1600<br>ng/well         | 1%BSA                     | 1:2                       | 1:2000                    | 100 $\mu$ L                |
| 反应条件  | 4 $^{\circ}$ C,<br>12 h | 37 $^{\circ}$ C,<br>1.5 h | 37 $^{\circ}$ C,<br>0.5 h | 37 $^{\circ}$ C,<br>0.5 h | 37 $^{\circ}$ C,<br>10 min |

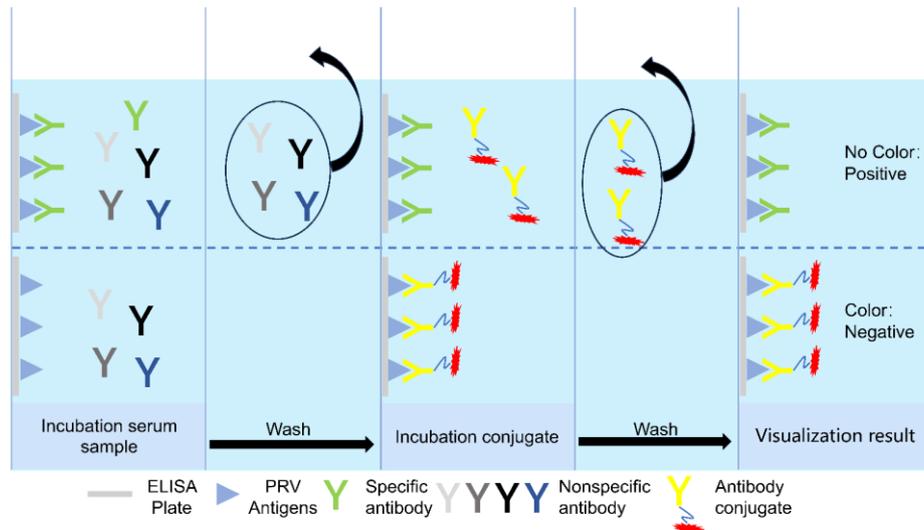


图 3-6 阻断 ELISA 反应示意图

Fig 3-6 Schematic diagram of blocking ELISA reaction

### 3.2.4 临界值的确定

根据优化的反应条件，用 MedCalc v15.8 软件对 400 份已知为 PRV gE 抗体阴性或阳性的猪血清样品进行检测和分析。结果表明，gE 抗体阻断 ELISA 在灵敏度为 98.3%、特异性为 99.1%时的最佳临界值为 0.5（图 3-7）。因此，对 ELISA 检测结果判断标准应为：当 S/N 值  $\leq 0.5$  时，为 gE 抗体阳性；当 S/N 值  $> 0.5$  时，为抗 gE 抗体阴性。

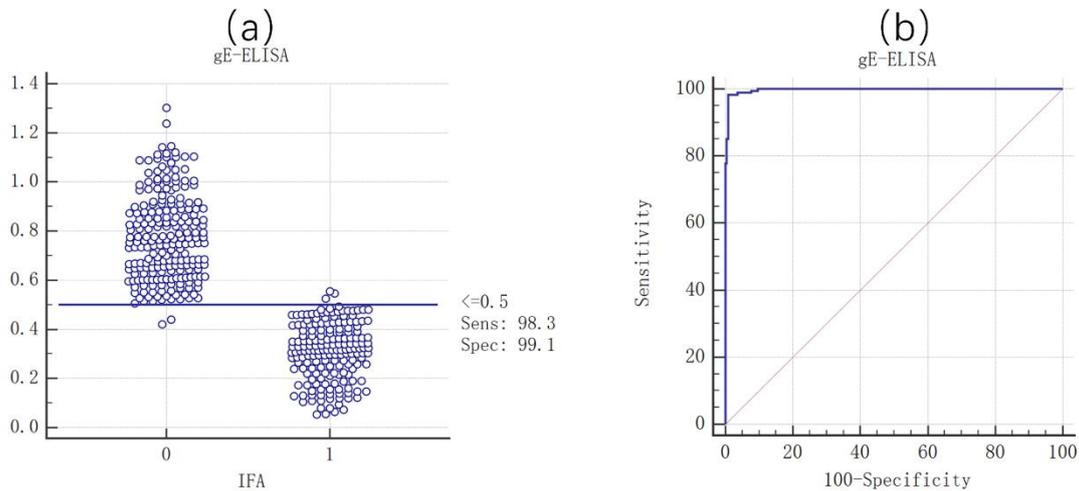


图 3-7 阻断 ELISA 临界值的确定

(a) 阴性样品检测结果的交互式点图分析，横坐标的 0 代表阴性，1 代表阳性；(b) 阴性样品的 ROC 曲线分析。

Fig 3-7 Determination of the critical value for blocking ELISA

(a) Interactive point plot analysis of detection results for positive and negative samples, where 0 on the horizontal axis represents negative and 1 represents positive; (b) The ROC curve analysis of positive and negative samples.

### 3.2.5 敏感性试验

根据优化的阻断 ELISA 方法，将猪血清 2 倍梯度稀释（1:2~1:2048），对 5 份猪血清进行检测。结果表明，gE 抗体阻断 ELISA 对 2 份 PRV 经典株感染和 3 份 PRV 变异株感染标准血清的敏感性均高于市售试剂盒。值得注意的是，gE 抗体阻断 ELISA 对 PRV 经典株感染血清和 PRV 变异株感染血清的敏感性比市售试剂盒均高出 0~2 倍。以上结果表明，与商业试剂盒相比，本研究建立的 gE 抗体阻断 ELISA 在检测针对 PRV 毒株的抗体方面的灵敏度上有所提高（图 3-8）。

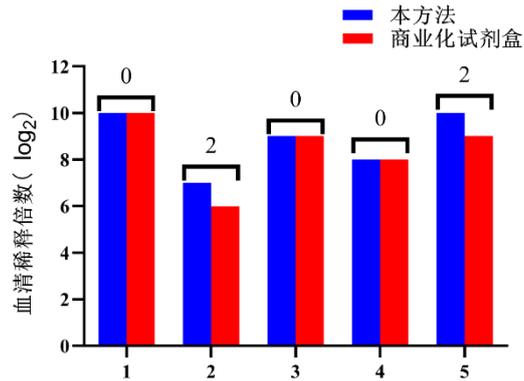


图 3-8 敏感性试验

条形图顶部的数字表示本方法可以检测的最大血清稀释度与商业试剂盒检测结果之间的比率。

Fig 3-8 Sensitive test

The number at the top of the bar chart indicates the ratio between the maximum serum dilution that can be detected by our method and the maximum serum dilution that can be detected by commercial kits.

### 3.2.6 特异性试验

根据优化的阻断 ELISA 法检测 PRV、PRRSV、ASFV、CSFV、PEDV、TGEV 和 PCV2 的特异性血清，结果显示只有 PRV 特异性血清检测结果为阳性。其他病毒阳性血清检测结果的 S/N 值均高于临界值（图 3-9），说明本研究建立的阻断 ELISA 方法具有良好的特异性。

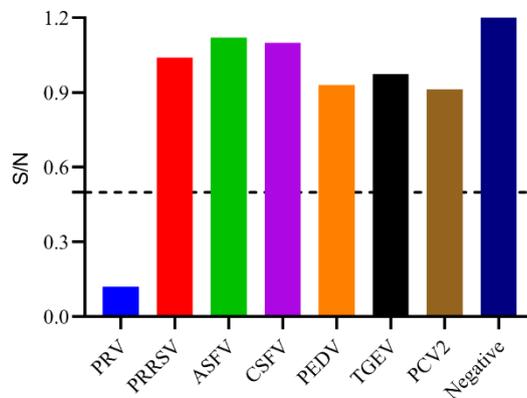


图 3-9 特异性试验

Fig 3-9 Specificity test

### 3.2.7 重复性试验

包被 3 个批次的 ELISA 板，从每批次板中随机各取 3 块板，进行批内和批间重复性试验，结果显示批内和批间重复性的变异系数均小于 5%（表 3-2），表明本研究建立的方法具有良好的重复性。

表 3-2 批内和批间重复性试验结果

Table 3-2 Results of intra - and inter batch repeatability tests

| 血清编号 | 批内重复实验       |        | 批间重复实验       |        |
|------|--------------|--------|--------------|--------|
|      | 平均数          | 变异系数   | 平均数          | 变异系数   |
|      | X±SD         | CV (%) | X±SD         | CV (%) |
| 1    | 0.127±0.0011 | 0.86   | 0.113±0.0023 | 2.03   |
| 2    | 0.415±0.0064 | 1.54   | 0.431±0.0076 | 1.76   |
| 3    | 0.176±0.0037 | 1.27   | 0.110±0.0012 | 1.09   |
| 4    | 0.868±0.0408 | 4.70   | 0.874±0.0278 | 3.18   |
| 5    | 0.899±0.0013 | 0.14   | 0.923±0.0080 | 0.86   |

### 3.2.8 临床样品的检测

对 492 份临床血清（已经经过 IFA 检测确定了阴性和阳性结果）利用本研究建立的 gE 阻断 ELISA、IDEXX 试剂盒以及国产试剂盒分别对其进行了进一步的检测分析。结果表明，本研究开发的 gE 抗体阻断 ELISA 与 IFA 的符合率为 97.76%，IDEXX 公司的 gE 抗体检测试剂盒与 IFA 的符合率为 95.73%，国产 gE 抗体检测试剂盒与 IFA 的符合率为 81.50%（表 3-3）。总体而言，本研究建立的检测方法与 IFA 的符合率显著高于国产试剂盒，同时与进口试剂盒相比也稍有提高。此外，值得注意的是，在阳性样本的检测中，本方法与 IFA 的符合率（96.26%）相对更高于两种市售试剂盒（IDEXX 92.52%，国产试剂盒 75.23%），体现出该方法较强的敏感性。

表 3-3 临床样本检测的符合率统计

Table 3-3 Statistics on the compliance rate of clinical sample testing

|       | 样品  | IFA    |        | 总数     |
|-------|-----|--------|--------|--------|
|       |     | 阳性     | 阴性     |        |
| 本方法   | 阳性  | 206    | 6      | 212    |
|       | 阴性  | 8      | 272    | 280    |
|       | 总数  | 214    | 278    | 492    |
|       | 符合率 | 96.26% | 97.84% | 97.15% |
| IDEXX | 阳性  | 198    | 5      | 204    |
|       | 阴性  | 13     | 273    | 288    |
|       | 总数  | 214    | 278    | 492    |
|       | 符合率 | 92.52% | 98.20% | 95.73% |
| 国产试剂盒 | 阳性  | 161    | 38     | 199    |
|       | 阴性  | 53     | 240    | 293    |
|       | 总数  | 214    | 278    | 492    |
|       | 符合率 | 75.23% | 86.33% | 81.50% |

### 3.2.9 免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势的检测

为了评估免疫前后以及攻毒后不同时间点的血清抗体水平，本研究利用优化好的 gE 抗体阻断 ELISA 检测免疫及攻毒后猪体内血清 gE 抗体变化趋势，同时，使用市售试剂盒（IDEXX）作为对照以进行比较。在动物实验中，免疫-攻毒组的 5 头猪都成功存活下来。然而，在攻毒组中，5 头猪仅存活 1 头。抗体检测结果显示，本研究中开发的 gE 抗体检测方法与市售试剂盒的检测结果一致，即免疫-攻毒组全程检测不到 gE 抗体转阳，攻毒对照组在攻毒后一周左右出 gE 抗体转阳。这两种方法都准确地呈现出免疫和攻毒后猪体内 gE 抗体水平的动态，同时，本方法相较于市售试剂盒（IDEXX）能够更早的检测到抗体的阳转（图 3-10），证明了该方法更高的敏感性。

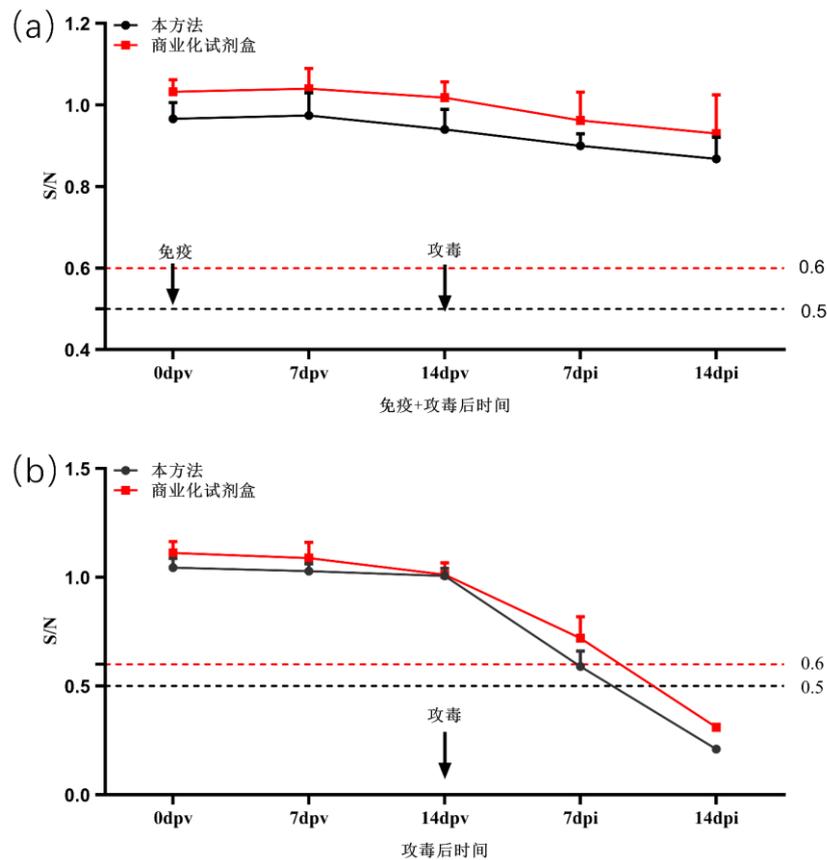


图 3-10 免疫-攻毒后不同时间点血清抗体变化趋势

(a) 免疫后 14 d 和攻毒后 14 d 内 gE 抗体水平的检测; (b) 免疫生理盐水 14 d 和攻毒后 14 d 内 gE 抗体水平的检测。

Fig 3-10 Results of antibody detection post-vaccination and post-infection.

(a) Anti-gE antibody levels within 14 days after immunization and within 14 days after challenge. (b) Piglets were injected with saline instead of the vaccine, but other conditions remained the same as those in the immune challenged group, and blood samples were collected at the same time.

Finally, anti-gE antibody was quantified.

### 3.3 讨论

预防和控制 PRV 的关键是接种疫苗同时配合相应的诊断技术。在诊断技术中, 抗体检测是重要的环节, PRV 的抗体检测有两个重要的指标, 即 gB 和 gE 抗体。gB 蛋白是 PRV 的关键免疫原性蛋白 (HELDWEIN et al., 2008; LI et al., 2017), 并且通过活疫苗和灭活疫苗免疫以及野生型病毒感染均可产生针对该蛋白的抗体 (GU et al., 2015; TONG et al., 2016)。gE 蛋白与 PRV 的毒力密切相关 (DELVA et al., 2020)。此外, 研究表明 gE 基因的缺失不会阻碍病毒复制 (FREULING et al., 2017)。因此, 迄今为止开发的大多数 PRV 疫苗均涉及 gE 基因缺失 (LIU et al., 2022), 遵循了可区别感染动物和免疫动物的原则 (DIVA)。在这种情况下, 通过检测 gB 抗体的水平可有助于研究人员及猪场技术人员了解猪的免疫状况, 确保适当的接种时间, 进而制定有效的疾病预防措施。另一方面, 通过检测 gE 抗体的水平则可判定猪只是否存在野毒感染, 这对疾病控制工作至关重要 (GUO et al., 2024)。欧美和其他一些国家已经通过免疫疫苗和相应的鉴别诊断完成了

PRV 的根除。

自 2011 年以来,中国报告了 PRV 变异株的出现,这给防控带来了新的挑战。截至目前为止,已经开发了许多针对 PRV 变异株的疫苗,但以前开发的抗体检测试剂盒仍在使用。虽然这些试剂盒在 PRV 检测中发挥了重要作用,但值得考虑的是,由于 PRV 经历了分子和抗原突变,以前针对 PRV 经典毒株设计的检测方法在目前的检测实践中可能会出现一些偏差 (PAN et al., 2022)。这一考虑突显了开发更灵敏的检测方法以有效应对 PRV 变异株流行的必要性。本研究对中国流行的伪狂犬病病毒变异株 (HeN1 株) 进行了灭活和纯化并以其作为免疫原免疫小鼠,并成功获得了一株针对 gE 蛋白的单克隆抗体,最后以该单克隆抗体建立了检测 gE 抗体的阻断 ELISA 方法。

在阻断 ELISA 抗体检测方法的建立中,除了灵敏且特异的单克隆抗体以外,包被抗原的选择也是不容忽视。目前,包被抗原的选择主要有两大类,一方面是利用各种蛋白表达系统表达重组蛋白,另一方面则是灭活纯化后的全病毒。表达的重组蛋白最大的优点就是在生产中无需操作活病毒,安全性较高,然而表达蛋白的构象结构无法比拟天然蛋白,因此在特异性上可能稍有欠缺。灭活纯化后的全病毒保持了病毒的天然结构,因而在检测中特异性可能更占优势,但是在对大批量活病毒的操作过程中可能存在泄露的风险,极易污染环境,另外由于 PRV 感染的动物种类较多 (WONG et al., 2019),尤其是近几年曾报道过人感染 PRV 的病例 (LIU et al., 2021),因此,在生产过程中,一旦出现活病毒的泄露,后果不堪设想。根据以上考虑,本研究选择了利用减毒的 PRV 毒株来作为包被抗原,一方面可以保持其反应上的特异性,另一方面提高其在生产中的安全性。在 PRV 的众多毒力基因中,TK 基因是 PRV 的主要毒力基因之一,该基因位于 UL 区,长度为 963 bp,共编码 320 个氨基酸。TK 基因有能够催化脱氧胸苷磷酸化的功能,与 PRV 在神经细胞中的复制息息相关。TK 基因仅在  $\alpha$  疱疹病毒亚科和  $\gamma$  疱疹病毒亚科中发现,该基因与细胞 TK 基因不同,在 dTTP 23 的合成中起关键作用,对于经典 PRV 毒株,TK 基因缺失的 PRV 突变体在小鼠、兔和猪中高度减毒,并在 PRV 攻击后为猪只提供保护性免疫 (KIT et al., 1985; MCGREGOR et al., 1985)。与经典毒株一致,TK 基因也是 PRV 变异株的重要毒力基因,在对 PRV 感染敏感的小鼠中,TK 基因敲除突变体完全丧失了致病性且神经毒力显著降低 (YE et al., 2019; TANG et al., 2017)。这一发现表明,未来针对 PRV 变异株的疫苗开发应该更好地抑制该基因。PRV TK 基因编码的胸苷激酶可以催化外源性胸腺嘧啶核苷参与核酸合成,而 BrdU 是胸腺嘧啶核苷的类似物,被胸苷激酶催化利用后,作为胸腺嘧啶核苷的替代物掺入到病毒基因组,使病毒核酸合成不能继续,所以在有一定浓度 BrdU 药物存在的情况下,只有 TK 基因缺失的病毒能够复制 (PRIETO et al., 1991)。在本研究中,利用 BrdU 药物筛选到一株 PRV TK 基因缺失的突变体 (HeN1- $\Delta$ TK-2 株),该毒株在小鼠中致病性完全丧失,这也就解决其在生产中的安全性问题,后续通过灭活处理后作为包被抗原,进一步的保证其在应用中的安全性。

本研究以减毒的 PRV TK 基因缺失突变株作为包被抗原,同时配合抗 gE 蛋白的特异性单克隆抗体建立了检测 gE 抗体的阻断 ELISA 方法,其敏感性高于市售试剂盒,且重复性良好;在临床样品的检测中,本方法与 IFA 的符合率显著高于国产试剂盒,且相较于进口试剂盒 (IDEXX) 也稍有提高,但是在具体检测中也存在一些问题,即在临床样品的检测中部分阳性样品的检测结果聚集在临界值附近 ( $S/N=0.5\sim 0.6$ ),后续将利用该部分样品对本方法进行进一步的优化,从而使检测结果的阴阳性更明显的被区分。

### 3.4 小结

1. 制备了一株 TK 基因缺失的 PRV 弱毒株 (HeN1- $\Delta$ TK-2 株), 该毒株在小鼠中完全丧失致病性, 可以作为安全的包被抗原。

2. 建立了检测 PRV gE 抗体的阻断 ELISA 方法, 该方法在检测部分血清的敏感性上高于进口试剂盒, 对另一部分血清的敏感性与进口试剂盒一致, 在攻毒后一周左右可以检测到抗体阳转与进口试剂盒检测结果一致。

## 第四章 结论

1. 制备了一株抗 PRV gE 蛋白且具有阻断效果的单克隆抗体 1C10A4, 该单抗识别一个保守的抗原表位 <sup>41</sup>PSAEVWD<sup>47</sup>。

2. 制备了一株 TK 基因缺失的 PRV 弱毒株 (HeN1- $\Delta$ TK-2 株), 该毒株在小鼠中完全丧失致病性, 可以作为安全的包被抗原。

3. 建立了检测 PRV gE 抗体的阻断 ELISA 方法, 该方法在检测部分血清的敏感性上高于进口试剂盒, 对另一部分血清的敏感性与进口试剂盒一致, 在攻毒后一周左右可以检测到抗体阳转与进口试剂盒检测结果一致。

## 参考文献

- 陈平洁, 2005. 广东省猪伪狂犬病流行病学调查和防控措施. 南京农业大学.
- 高俊锋, 赖志, 舒银辉, 漆世华, 马晶晶, 吴碧清, 龚建培, 2015. 猪伪狂犬病毒 C 株的分离鉴定. 上海农业学报, 31(01): 32-36.
- 郭镇洋, 田志军, 彭金美, 2023. 中国猪伪狂犬病的流行及防控. 中国科学:生命科学, 53(12): 1780-1793.
- 郭镇洋, 赵静, 付军, 许浒, 李超, 李宛生, 孙琪, 裴艳艳, 龚帮俊, 王倩, 周国辉, 汤艳东, 冷超粮, 王永杰, 陈长青, 安同庆, 蔡雪辉, 张洪亮, 田志军, 彭金美, 2023. 2016~2021 年我国猪伪狂犬病病毒的分子流行病学调查与分析. 中国预防兽医学报, 45(02): 122-128.
- 何启盖, 陈焕春, 方六荣, 吴斌, 刘正飞, 肖少波, 金梅林, 2006. 猪伪狂犬病病毒双基因缺失突变株(HB-98 株)安全性、稳定性和免疫原性测定. 中国兽医学报, 26(02): 165-168.
- 姜辰龙, 马梓承, 吕林, 刘星, 白娟, 孙杨杨, 姜平, 2022. 猪伪狂犬病病毒 ZJ01ΔgI/gE/TK 株种子批的免疫原性鉴定. 中国兽医科学, 52(07): 861-866.
- 刘正飞, 陈焕春, 吴斌, 何启盖, 秦永辉, 2004. 伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>基因缺失疫苗的安全性和保护力研究. 畜牧兽医学报, 35(01): 70-73.
- 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 刘益民, 陈家程, 冷超粮, 孙艳, 常丹, 田志军, 童光志, 2013. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析. 中国预防兽医学报, 35(01): 1-4.
- 彭金美, 王瑜, 田志军, 周艳君, 陈瑾, 安同庆, 童光志, 2009. 带 BAC 质粒的重组伪狂犬病毒的构建及其体外生长特性研究. 中国预防兽医学报, 31(01): 10-15.
- 童光志, 陈焕春, 1999. 伪狂犬病流行现状及我国应采取的防控措施. 中国兽医学报, 19(01).
- 童武, 郑浩, 单同领, 刘飞, 梁超, 李国新, 姜一峰, 于海, 高飞, 周艳君, 童光志, 2014. 伪狂犬病毒变异株(JS-2012)对仔猪的致病性研究. 中国动物传染病学报, 22(05): 10-14.
- 吴桐, 彭金美, 田志军, 王倩, 陈志宝, 赵蕊, 2017. 猪伪狂犬病病毒 HeN1 株 gE 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定. 中国预防兽医学报, 39(02): 143-147.
- 徐志文, 郭万柱, 朱玲, 唐善虎, 2004. 伪狂犬病病毒 3 基因缺失株(SA215)的遗传稳定性研究. 畜牧兽医学报, 35(06):694-697.
- 叶超, 赵款, 郭金潮, 姜成刚, 常晓博, 王淑杰, 王同云, 彭金美, 蔡雪辉, 田志军, 安同庆, 2015. 猪伪狂犬病病毒 HeN1 株全基因组测序及感染和毒力相关基因的变异特征分析. 中国预防兽医学报, 37(08): 581-584.
- 袁庆志, 礼卓然, 南锡, 吴裕祥, 李亚香, 1987. 猪伪狂犬病病毒的分离与鉴定. 中国畜禽传染病, (03): 10-11.
- 袁庆志, 吴裕祥, 礼卓然, 李亚香, 南锡, 王丽萍, 1986. 伪狂犬病免疫的研究 III. 伪狂犬病弱毒冻干疫苗对猪和牛区域性安全试验. 家畜传染病, (01): 13-15.
- 袁庆志, 吴裕祥, 李亚香, 礼卓然, 南锡, 1985. 伪狂犬病免疫的研究 II. 伪狂犬病弱毒冻干疫苗保存期和免疫期试验. 家畜传染病, (03): 11-17.
- 袁庆志, 吴裕祥, 李亚香, 礼卓然, 南锡, 1983. 伪狂犬病免疫的研究 I. 伪狂犬病弱毒疫苗的研究.

- 家畜传染病, (01): 1-6.
- 张明辉, 库旭钢, 凌云志, 杨子靖, 何启盖, 2015. 猪伪狂犬病病毒 HNX 株在免疫猪群中水平传播能力的研究. *中国预防兽医学报*, 37(06): 426-429.
- 赵鸿远, 彭金美, 安同庆, 李琳, 冷超粮, 陈家镒, 王倩, 常丹, 张秋月, 蔡雪辉, 童光志, 田志军, 2014. 猪伪狂犬病病毒变异株的分离鉴定及其 gE 基因的分子特征. *中国预防兽医学报*, 36(07): 506-509.
- 赵静, 2021. 猪伪狂犬病病毒 gB 抗体阻断 ELISA 检测方法的建立及初步应用. 中国农业科学院.
- AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, ZHAO H Y, LI N, LIU Y M, CHEN J Z, LENG C L, SUN Y, CHANG D, TONG G Z, 2013. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012. *Emerg Infect Dis*, 19(11): 1749-1755. DOI: 10.3201/eid1911.130177.
- BO Z, LI X, 2022. A Review of pseudorabies virus variants: genomics, vaccination, transmission, and zoonotic potential. *Viruses*, 14(5). DOI: 10.3390/v14051003.
- BO Z, MIAO Y, XI R, GAO X, MIAO D, CHEN H, JUNG Y S, QIAN Y, DAI J, 2021. Emergence of a novel pathogenic recombinant virus from Bartha vaccine and variant pseudorabies virus in China. *Transbound Emerg Dis*, 68(3): 1454-1464. DOI: 10.1111/tbed.13813.
- DELVA J L, NAUWYNCK H J, METTENLEITER T C, FAVOREEL H W, 2020. The attenuated pseudorabies virus vaccine strain Bartha K61: A brief review on the knowledge gathered during 60 years of research. *Pathogens*, 9(11). DOI: 10.3390/pathogens9110897.
- FREULING C M, MULLER T F, METTENLEITER T C, 2017. Vaccines against pseudorabies virus (PrV). *Vet Microbiol*, 206: 3-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.11.019.
- GARVEY M, 2022. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics. *J Fungi (Basel)*, 8(11). DOI: 10.3390/jof8111179.
- GRUNEWALD K, DESAI P, WINKLER D C, HEYMANN J B, BELNAP D M, BAUMEISTER W, STEVEN A C, 2003. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, 302(5649): 1396-1398. DOI: 10.1126/science.1090284.
- GU Z, DONG J, WANG J, HOU C, SUN H, YANG W, BAI J, JIANG P, 2015. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge. *Virus Res*, 195: 57-63. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.09.003.
- GUO Z, XU H, ZHANG S, KANG H, LI C, SUN Q, ZHAO J, LI J, ZHOU G, WANG Q, XIANG L, TANG Y, LIU H, LENG C, AN T, CAI X, TIAN Z, ZHANG H, PENG J, 2024. Improved detection sensitivity of anti-PRV variant antibodies through preparation of anti-gB and anti-gE monoclonal antibodies and development of blocking ELISAs. *Int J Biol Macromol*, 260(Pt 1): 129425. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129425.
- GUO Z, ZHANG S, XU H, LI W, LI C, ZHAO J, GONG B, SUN Q, XIANG L, ZHAO H, WANG Q, ZHOU G, TANG Y, AN T, CAI X, TIAN Z, ZHANG H, PENG J, 2023. Preparation and identification of a monoclonal antibody against the pseudorabies virus gE glycoprotein through a novel strategy. *Vet Sci*, 10(2). DOI: 10.3390/vetsci10020133.
- GUTEKUNST D E, PIRTLE E C, MILLER L D, STEWART W C, 1980. Isolation of pseudorabies virus

- from trigeminal ganglia of a latently infected sow. *Am J Vet Res*, 41(8): 1315-1316.
- HE W, AUCLERT L Z, ZHAI X, WONG G, ZHANG C, ZHU H, XING G, WANG S, HE W, LI K, WANG L, HAN G Z, VEIT M, ZHOU J, SU S, 2019. Interspecies transmission, genetic diversity, and evolutionary dynamics of pseudorabies virus. *J Infect Dis*, 219(11): 1705-1715. DOI: 10.1093/infdis/jiy731.
- HELDWEIN E E, KRUMMENACHER C, 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 65(11): 1653-1668. DOI: 10.1007/s00018-008-7570-z.
- KIT S, KIT M, PIRTLE E C, 1985. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am J Vet Res*, 46(6): 1359-1367.
- KIT S, SHEPPARD M, ICHIMURA H, KIT M, 1987. Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am J Vet Res*, 48(5): 780-793.
- KRAMER T, GRECO T M, ENQUIST L W, CRISTEA I M, 2011. Proteomic characterization of pseudorabies virus extracellular virions. *J Virol*, 85(13): 6427-6441. DOI: 10.1128/JVI.02253-10.
- LEE J Y, WILSON M R, 1979. A review of pseudorabies (Aujeszky's disease) in pigs. *Can Vet J*, 20(3): 65-69.
- LI X, YANG F, HU X, TAN F, QI J, PENG R, WANG M, CHAI Y, HAO L, DENG J, BAI C, WANG J, SONG H, TAN S, LU G, GAO G F, SHI Y, TIAN K, 2017. Two classes of protective antibodies against Pseudorabies virus variant glycoprotein B: Implications for vaccine design. *PLoS Pathog*, 13(12): e1006777. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006777.
- LIAN Z, LIU P, ZHU Z, SUN Z, YU X, DENG J, LI R, LI X, TIAN K, 2023. Isolation and characterization of a novel recombinant classical pseudorabies virus in the context of the variant strains pandemic in China. *Viruses*, 15(9). DOI: 10.3390/v15091966.
- LIANG C, TONG W, ZHENG H, LIU F, WU J, LI G, ZHOU E M, TONG G, 2017. A high-temperature passaging attenuated pseudorabies vaccine protects piglets completely against emerging PRV variant. *Res Vet Sci*, 112: 109-115. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.02.008.
- LIU Q, KUANG Y, LI Y, GUO H, ZHOU C, GUO S, TAN C, WU B, CHEN H, WANG X, 2022. The epidemiology and variation in pseudorabies virus: A continuing challenge to pigs and humans. *Viruses*, 14(7). DOI: 10.3390/v14071463.
- LIU Q, WANG X, XIE C, DING S, YANG H, GUO S, LI J, QIN L, BAN F, WANG D, WANG C, FENG L, MA H, WU B, ZHANG L, DONG C, XING L, ZHANG J, CHEN H, YAN R, WANG X, LI W, 2021. A novel human acute encephalitis caused by pseudorabies virus variant strain. *Clin Infect Dis*, 73(11): e3690-e3700. DOI: 10.1093/cid/ciaa987.
- LUO Y, LI N, CONG X, WANG C H, Du M, LI L, ZHAO B, YUAN J, LIU D D, LI S, LI Y, SUN Y, QIU H J, 2014. Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China. *Vet Microbiol*, 174(1-2): 107-115. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.09.003.
- MA X, CUI Y, QIU Z, ZHANG B, CUI S, 2013. A nanoparticle-assisted PCR assay to improve the sensitivity for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies virus and gene-deleted

- vaccine strains. *J Virol Methods*, 193(2): 374-378. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.07.018.
- MCFERRAN J B, DOW C, 1975. Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci*, 19(1): 17-22.
- MCGREGOR S, EASTERDAY B C, KAPLAN A S, BEN-PORAT T, 1985. Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. *Am J Vet Res*, 46(7): 1494-1497.
- METTENLEITER T C, 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res*, 31(1): 99-115. DOI: 10.1051/vetres:2000110.
- METTENLEITER T C, KLUPP B G, GRANZOW H, 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*, 143(2): 222-234. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.03.018.
- METTENLEITER T C, KLUPP B G, WEILAND F, VISSER N, 1994. Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted pseudorabies virus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine. *J Gen Virol*, 75 (Pt 7): 1723-1733. DOI: 10.1099/0022-1317-75-7-1723.
- MULDER W A, POL J M, GRUYS E, JACOBS L, De JONG M C, PEETERS B P, KIMMAN T G, 1997. Pseudorabies virus infections in pigs. Role of viral proteins in virulence, pathogenesis and transmission. *Vet Res*, 28(1): 1-17.
- NAWYNCK H J, PENZAERT M B, 1995. Cell-free and cell-associated viremia in pigs after oronasal infection with Aujeszky's disease virus. *Vet Microbiol*, 43(4): 307-314. DOI: 10.1016/0378-1135(94)00103-4.
- NIE Z, ZHU S, WU L, SUN R, SHU J, HE Y, FENG H, 2023. Progress on innate immune evasion and live attenuated vaccine of pseudorabies virus. *Front Microbiol*, 14: 1138016. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1138016.
- NOSAKI S, HOSHIKAWA K, EZURA H, MIURA K, 2021. Transient protein expression systems in plants and their applications. *Plant Biotechnol (Tokyo)*, 38(3): 297-304. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.21.0610a.
- PAN J, LI Y, WANG T, CHANG J, HAO L, CHEN J, PENG W, DENG J, HUANG B, TIAN K, 2022. A poly (dimethylsiloxane)-based solid-phase microchip platform for dual detection of pseudorabies virus gD and gE antibodies. *Front Cell Infect Microbiol*, 12: 912108. DOI: 10.3389/fcimb.2022.912108.
- PAPAGEORGIOU K V, MICHAILEDIOU M, GRIVAS I, PETRIDOU E, STAMELOU E, EFRAIMIDIS K, CHEN L, DREW T W, KRITAS S K, 2022. Bartha-K61 vaccine protects nursery pigs against challenge with novel European and Asian strains of suid Herpesvirus 1. *Vet Res*, 53(1): 47. DOI: 10.1186/s13567-022-01063-8.
- POMERANZ L E, REYNOLDS A E, HENGARTNER C J, 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(3): 462-500. DOI: 10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005.
- POPA C M, TABUCHI M, VALLS M, 2016. Modification of bacterial effector proteins inside eukaryotic host cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 73. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00073.
- PRIETO J, MARTIN H A, TABARES E, 1991. Loss of pseudorabies virus thymidine kinase activity due to a single base mutation and amino acid substitution. *J Gen Virol*, 72 (Pt 6): 1435-1439. DOI:

- 10.1099/0022-1317-72-6-1435.
- PRIOLA S A, GUSTAFSON D P, WAGNER E K, STEVENS J G, 1990. A major portion of the latent pseudorabies virus genome is transcribed in trigeminal ganglia of pigs. *J Virol*, 64(10): 4755-4760. DOI: 10.1128/JVI.64.10.4755-4760.1990.
- SEHL J, TEIFKE J P, 2020. Comparative Pathology of Pseudorabies in different naturally and experimentally infected species-A review. *Pathogens (Basel)*, 9(8): 633. DOI: 10.3390/pathogens9080633.
- SHOPE R E, 1931. An experimental study of "mad itch" with especial reference to its relationship to pseudorabies. *J Exp Med*, 54(2): 233-248. DOI: 10.1084/jem.54.2.233.
- SKODA R, BRAUNER I, SADECKY E, MAYER V, 1964. Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. I. Attenuation of virus and some properties of attenuated strains. *Acta Virol*, 8: 1-9.
- SUN Y, LIANG W, LIU Q, ZHAO T, ZHU H, HUA L, PENG Z, TANG X, STRATTON C W, ZHOU D, TIAN Y, CHEN H, WU B, 2018. Epidemiological and genetic characteristics of swine pseudorabies virus in mainland China between 2012 and 2017. *PeerJ*, 6: e5785. DOI: 10.7717/peerj.5785.
- SUN Y, LUO Y, WANG C H, YUAN J, LI N, SONG K, QIU H J, 2016. Control of swine pseudorabies in China: Opportunities and limitations. *Vet Microbiol*, 183: 119-124. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.12.008.
- TAN L, YAO J, YANG Y, LUO W, YUAN X, YANG L, WANG A, 2021. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China. *Virol Sin*, 36(4): 588-607. DOI: 10.1007/s12250-020-00340-0.
- TANG Y D, LIU J T, WANG T Y, SUN M X, TIAN Z J, CAI X H, 2017. Comparison of pathogenicity-related genes in the current pseudorabies virus outbreak in China. *Sci Rep*, 7(1): 7783. DOI: 10.1038/s41598-017-08269-3.
- TONG W, LI G, LIANG C, LIU F, TIAN Q, CAO Y, LI L, ZHENG X, ZHENG H, TONG G, 2016. A live, attenuated pseudorabies virus strain JS-2012 deleted for gE/gI protects against both classical and emerging strains. *Antiviral Res*, 130: 110-117. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.03.002.
- TONG W, LIU F, ZHENG H, LIANG C, ZHOU Y J, JIANG Y F, SHAN T L, GAO F, LI G X, TONG G Z, 2015. Emergence of a pseudorabies virus variant with increased virulence to piglets. *Vet Microbiol*, 181(3-4): 236-240. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.09.021.
- TRAUB E, 1933. Cultivation of pseudorabies virus. *J Exp Med*, 58(6): 663-681. DOI: 10.1084/jem.58.6.663.
- WANG T, XIAO Y, YANG Q, WANG Y, SUN Z, ZHANG C, YAN S, WANG J, GUO L, YAN H, GAO Z, WANG L, LI X, TAN F, TIAN K, 2015. Construction of a gE-deleted pseudorabies virus and its efficacy to the new-emerging variant PRV challenge in the form of killed vaccine. *Biomed Res Int*, 2015: 684945. DOI: 10.1155/2015/684945.
- WONG G, LU J, ZHANG W, GAO G F, 2019. Pseudorabies Virus: a neglected zoonotic pathogen in humans? *Emerg Microbes Infect*, 8(1): 150-154. DOI: 10.1080/22221751.2018.1563459.
- XU J J, WU J Q, CHENG X F, TONG W, ZHENG H, ZHU H J, LIU Y T, JIANG Y F, GAO F, YU H, SHAN T L, LI G X, TONG G Z, 2019. Identification of two novel epitopes targeting glycoprotein E

- of pseudorabies virus using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 519(2): 330-336. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.168.
- YE C, CHEN J, CHENG X, ZHOU S, JIANG S, XU J, ZHENG H, TONG W, LI G, TONG G, 2019. Functional analysis of the UL24 protein of Suid Herpesvirus 1. *Virus Genes*, 55(1): 76-86. DOI: 10.1007/s11262-018-1619-3.
- YE C, GUO J C, GAO J C, WANG T Y, ZHAO K, CHANG X B, WANG Q, PENG J M, TIAN Z J, CAI X H, TONG G Z, AN T Q, 2016. Genomic analyses reveal that partial sequence of an earlier pseudorabies virus in China is originated from a Bartha-vaccine-like strain. *Virology*, 491: 56-63. DOI: 10.1016/j.virol.2016.01.016.
- YE C, ZHANG Q Z, TIAN Z J, ZHENG H, ZHAO K, LIU F, GUO J C, TONG W, JIANG C G, WANG S J, SHI M, CHANG X B, JIANG Y F, PENG J M, ZHOU Y J, TANG Y D, SUN M X, CAI X H, AN T Q, TONG G Z, 2015. Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: Evidence for the existence of two major genotypes. *Virology*, 483: 32-43. DOI: 10.1016/j.virol.2015.04.013.
- YE G, LIU H, ZHOU Q, LIU X, HUANG L, WENG C, 2022. A tug of war: Pseudorabies virus and host antiviral innate immunity. *Viruses*, 14(3). DOI: 10.3390/v14030547.
- YU X, ZHOU Z, HU D, ZHANG Q, HAN T, LI X, GU X, YUAN L, ZHANG S, WANG B, QU P, LIU J, ZHAI X, TIAN K, 2014. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012. *Emerg Infect Dis*, 20(1): 102-104. DOI: 10.3201/eid2001.130531.
- ZHANG P, LV L, SUN H, LI S, FAN H, WANG X, BAI J, JIANG P, 2019. Identification of linear B cell epitope on gB, gC, and gE proteins of porcine pseudorabies virus using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 234: 83-91. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.05.013.