

分类号：S852.3

授予学位单位代码：10434
学号：2022120648

山東農業大學

硕士学位论文

猪瘟病毒流行株分离及 E^{rns} 检测方法的建立

Isolation of Classical Swine Fever Virus Field Strains and
Establishment of E^{rns} Detection Method

姓 名：王明伟

学 位 类 别：兽医硕士

专 业：兽医

研 究 方 向：动物疫病防控

学 院：动物医学院

指 导 教 师：肖一红教授
刘业兵研究员

2024 年 5 月 26 日

论文提交日期：2024.04.06

论文答辩日期：2024.05.20

学位授予日期：2024.06

学 位 类 别：兽医硕士

答辩委员会主席：高玉龙

本研究由
国家重点研发计划项目“猪瘟诊断与鉴别技术研究”
(2023YFD1800504)
山东省重点研发计划(重大科技创新工程)
(2023CXGC010705)
提供资助

符号说明

AMP	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟病毒
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HAT	Hypoxantin aminopterin thymidin	次黄嘌呤 氨基蝶呤 胸腺嘧啶 脱氧核苷
HT	Hypoxantin thymidin	次黄嘌呤 胸腺嘧啶脱氧核苷
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
KDa	Kilodaltons	千道尔顿
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
pH	Potential of hydrogen	氢离子浓度指数
PK-15	Porcine Kidney-15	猪肾细胞
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
rpm	Revolutions per minute	每分钟旋转次数
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction	逆转录聚合酶链式反应
TAE	Tris acetate-EDTA buffer	核酸电泳缓冲液

目 录

1 前言.....	1
1.1 猪瘟概述.....	1
1.2 CSFV 的形态结构及理化特性	1
1.3 CSFV 的基因组结构.....	2
1.4 CSFV 分子遗传进化.....	3
1.5 CSFV 的检测方法.....	3
1.5.1 CSFV 的分离.....	3
1.5.2 CSFV 血清学检测方法.....	4
1.5.3 CSFV 分子生物学检测方法.....	5
1.6 CSF 的防控措施	5
1.7 CSFV 抗原表位与单克隆抗体研究	5
1.8 CSFV 单抗及其在猪瘟诊断中的应用	7
1.9 研究的目的及意义.....	7
2 材料与方法.....	9
2.1 材料.....	9
2.1.1 CSFV 组织样本.....	9
2.1.2 实验动物、毒株及细胞系.....	9
2.1.3 实验场所.....	9
2.1.4 主要试剂.....	9
2.1.5 主要实验仪器.....	11
2.1.6 主要试剂配制.....	11
2.1.7 生物信息学软件.....	13
2.2 方法.....	14
2.2.1 CSFV 流行株的分离.....	14
2.2.2 CSFV E ^{ms} 蛋白的真核表达	17
2.2.3 CSFV E ^{ms} 单克隆抗体的制备及鉴定	21
2.2.4 CSFV 间接免疫荧光方法的初步建立	26
2.2.5 CSFV E ^{ms} 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	27
3 结果与分析.....	30
3.1 CSFV 流行株的分离.....	30
3.1.1 CSFV 流行株 E2 基因分析结果	31
3.1.2 CSFV 流行株 E ^{ms} 基因分析结果	32
3.2 CSFV E ^{ms} 蛋白的真核表达	35
3.2.1 重组杆状质粒的酶切验证.....	35

3.2.2 重组杆状质粒的转座验证.....	36
3.2.3 重组杆状病毒的鉴定.....	37
3.2.4 CSFV E ^{rns} 蛋白表达性鉴定	37
3.2.5 CSFV E ^{rns} 蛋白的纯化	38
3.3 CSFV E ^{rns} 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定	40
3.3.1 CSFV E ^{rns} 蛋白单克隆抗体的制备	40
3.3.2 CSFV E ^{rns} 蛋白单克隆抗体的鉴定	42
3.4 CSFV 间接免疫荧光方法的初步建立	49
3.5 CSFV E ^{rns} 抗体间接 ELISA 方法的建立	50
3.5.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定	50
3.5.2 包被条件的确定.....	50
3.5.3 最佳封闭液确定.....	50
3.5.4 最佳封闭条件的确定.....	51
3.5.5 最佳酶标抗体工作浓度的确定.....	51
3.5.6 底物反应时间的确定.....	52
3.5.7 重复性试验.....	52
3.5.8 临界值的确定.....	53
3.5.9 特异性试验.....	54
3.5.10 符合性试验.....	54
3.5.11 CSFV E ^{rns} 抗体间接 ELISA 检测方法的应用	55
4 讨论.....	56
4.1 CSFV 流行株 E ^{rns} 氨基酸序列分析	56
4.2 CSFV E ^{rns} 蛋白表达分析	56
4.3 单克隆抗体表位预测分析	57
4.4 E ^{rns} 蛋白抗体及其特性分析	57
4.5 E ^{rns} 单抗的阻断效果分析及应用分析	58
4.6 CSFV E ^{rns} 抗体检测分析	59
5 结论.....	61
参考文献.....	62

中文摘要

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种只感染猪的传染病, 在我国为二类动物疫病。猪瘟 C 株弱毒疫苗的广泛应用有效的控制了猪瘟的流行, 使我国实现猪瘟净化成为可能。但目前现有的弱毒疫苗无法与野毒感染进行鉴别诊断, 极大的限制了猪瘟净化的进程。因此, 可鉴别的猪瘟疫苗的推广是未来猪瘟净化的必由之路。猪瘟 E2 亚单位疫苗是我国目前获批的唯一能进行疫苗免疫与野毒感染鉴别的猪瘟疫苗产品, 但用于其配套检测的商品化 E^{ms} 抗体检测试剂盒却仍是空白。基于以上背景, 本研究通过对猪瘟国内流行株的分离, 进行遗传演化分析, 并选出优势毒株, 表达 E^{ms} 蛋白, 制备其单克隆抗体, 以期建立检测 E^{ms} 抗原和抗体检测方法。

本研究对国家猪瘟参考实验室 2022~2023 年收集的猪瘟病毒样本进行猪瘟病毒分离鉴定, 得到了 12 株流行野毒分离株。通过 E2 基因和 E^{ms} 基因的测序, 分别绘制了遗传进化树, 结果显示: 其 E2 基因与 E^{ms} 基因分型结果相同, 11 株为 2.1 亚型 (其中 10 株为 2.1b 亚亚型, 1 株为 2.1c 亚亚型)、1 株为 2.2 亚型。以得到的主要流行毒株的 E^{ms} 基因为模板, 将其插入杆状表达质粒 pFastbacHT B 中, 通过 Bac-to-Bac 表达系统在 SF9 细胞中表达 E^{ms} 蛋白, 纯化蛋白经 Western Blot 鉴定, 与猪瘟病毒阳性血清有特异性反应。将纯化的 E^{ms} 蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 经 ELISA 和间接免疫荧光双重筛选, 获得 5 株分泌 E^{ms} 单抗的杂交瘤细胞, 分别命名为 Mab-E^{ms}-1, Mab-E^{ms}-2, Mab-E^{ms}-3, Mab-E^{ms}-4, Mab-E^{ms}-5。经鉴定, 5 株单抗的抗体亚型鉴定均为 IgG1 型; 5 株单抗与不同流行毒株 (2.1 和 2.2 亚型) 的反应性存在差异, 但均不与 1.1 基因亚型的疫苗株 (C 株) 和 SM 株反应, 与猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、圆环病毒 2 型 (PCV2) 及猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 等没有交叉反应。中和试验证明, 5 株单抗对猪瘟病毒均无中和活性。将 5 株单克隆抗体采用猪瘟阳性血清进行阻断试验, 证明阳性血清无法完全阻断单抗与 E^{ms} 蛋白结合, 最高的阻断率仅为 46.20%。采用生物信息学软件对 E^{ms} 蛋白结构及其表位进行预测, 发现 E^{ms} 蛋白的抗原表位数量较多且较为分散, 可能是导致其阻断效果不佳的原因。将 Mab-E^{ms}-1 和 Mab-E^{ms}-5 单抗等比例混合后, 对流行毒株和疫苗毒株进行 IFA 检测, 结果证明, 混合单抗能与 12 株基因 2 型流行毒株全部反应, 但与 1.1 基因亚型毒株不反应, 初步建立了以检测 E^{ms} 蛋白为基础的 IFA

方法用于疫苗毒和流行野毒鉴别检验。

在本研究表达纯化的 E^{rns} 蛋白基础上，建立了一种检测 E^{rns} 抗体的间接 ELISA 方法。试验条件经过优化，最终确认最佳包被浓度为 0.31 μ g/mL，血清稀释度为 1:100；最佳包被条件为 4 $^{\circ}$ C 包被 16 h；最佳封闭液为 10% 脱脂奶粉；最佳封闭条件为 4 $^{\circ}$ C 封闭 16 h；最佳酶标二抗稀释度为 1:15,000；最佳底物反应时间为 10 min。该方法的板内与板间重复变异系数均低于 10%，证明该 ELISA 方法具有良好的可重复性。建立的 ELISA 方法与 PPV，PRV，PRRSV，非洲猪瘟病毒（ASFV）和 PCV2 的阳性血清均无交叉反应；本方法与中和试验的符合率为 78.57%，与商品化试剂盒（检测 E2 蛋白抗体）的符合率为 84.67%。

综上，本研究分离到 12 株 CSFV 流行毒株，其中 11 株为 2.1 亚型，1 株为 2.2 亚型，说明我国的流行毒株仍为 2.1 亚型为主；从中选择最有代表性的毒株作为亲本序列表达了 E^{rns} 蛋白，制备了 5 株 E^{rns} 单抗。采用其中 2 株单抗初步建立了可以鉴别检测 CSFV 疫苗和野毒的间接免疫荧光方法；采用表达纯化的 E^{rns} 蛋白初步建立了检测 E^{rns} 抗体的间接 ELISA 方法，可作为猪瘟 E2 亚单位疫苗的配套检测试剂用于临床样本的检测。

关键字：猪瘟病毒，E^{rns} 蛋白，单克隆抗体，间接 ELISA

Isolation of Classical Swine Fever Virus Field Strains and Establishment of E^{ms} Detection Method

Abstract

Classical swine fever (CSF) is an infectious disease caused by classical swine fever virus (CSFV) that only infects pigs, and it is a Class II animal disease in China. The widespread use of CSFV weak vaccine has effectively controlled the epidemic of swine fever and made it possible to realize the purification of classical swine fever in China. However, the existing weakly virulent vaccine is unable to perform differential diagnosis with wild virus infection, which greatly limits the process of classical swine fever purification. Therefore, the promotion of a vaccine for classical swine fever that can be used for differential diagnosis is a must for classical swine fever purification in the future. The swine fever E2 subunit vaccine is the only classical swine fever vaccine product approved in China that can discriminate between vaccine immunization and wild virus infection, but the commercialized E^{ms} antibody test kit for its detection is still blank. Based on the above background, this study was conducted to isolate the domestic epidemic strains of classical swine fever, analyze the genetic evolution, and select the dominant strains, express the E^{ms} proteins, and prepare their monoclonal antibodies, with the aim of establishing a method for detecting E^{ms} antigens and antibodies.

In this study, classical swine fever virus isolation and characterization were carried out on classical swine fever virus samples collected from the National Classical Swine Fever Reference Laboratory from 2022 to 2023, and 12 epidemic wild virus isolates were obtained. The genetic evolution tree was drawn by sequencing the E2 and E^{ms} genes, respectively, and the results showed that their E2 and E^{ms} genotyping results were the same, with 11 strains of subtype 2.1 (of which 10 strains were of subtype 2.1b, and one was of subtype 2.1c) and one of subtype 2.2. The E^{ms} gene of the obtained major epidemic strains was used as a template, which was inserted into the rod expression plasmid pFastbacHT B. The E^{ms} protein was expressed in SF9 cells through the Bac-to-Bac expression system, and the purified protein was identified by Western Blot, which showed specific reaction with the positive serum of classical swine fever

virus. The purified E^{ms} protein was used as antigen to immunize BALB/c mice, and five strains of hybridoma cells secreting E^{ms} monoclonal antibody were obtained by double screening of ELISA and Indirect immunofluorescence Assay (IFA), which were named Mab-E^{ms}-1, Mab-E^{ms}-2, Mab-E^{ms}-3, Mab-E^{ms}-4, and Mab-E^{ms}-5. The antibody subtypes of the five monoclonal antibodies were identified as IgG1; the reactivity of the five monoclonal antibodies varied with different prevalent strains (subtypes 2.1 and 2.2), but none of them reacted with vaccine strains of genotype subtype 1.1 and SM strains, and with porcine poliovirus (PPV), porcine pseudorabies virus (PRV), circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Neutralization test proved that none of the five monoclonal antibodies had neutralizing activity against classical swine fever virus. The five monoclonal antibodies were blocked by classical swine fever positive serum, which proved that the positive serum could not completely block the monoclonal antibodies from binding to E^{ms} protein, and the highest blocking rate was only 46.20%. Bioinformatics software was used to predict the structure of E^{ms} protein and its epitopes, and it was found that the antigenic epitopes of E^{ms} protein were more numerous and scattered, which might be the reason for its poor blocking effect. Mab-E^{ms}-1 and Mab-E^{ms}-5 monoclonal antibodies were mixed in equal proportions and subjected to IFA for both epidemic and vaccine strains. The results demonstrated that the mixed monoclonal antibodies reacted with all of the 12 genotype 2 epidemic strains but not with the genotype 1.1 subtype strains, and initially established an IFA method based on the detection of the E^{ms} proteins for the discriminatory testing of vaccine and epidemic wild viruses.

Based on the expression and purification of E^{ms} protein in this study, an indirect ELISA method for detecting E^{ms} antibodies was established. After optimizing the experimental conditions, it was finally confirmed that the optimal coating concentration was 0.3125 μ g/mL, serum dilution 1:100; The optimal coating condition is 4°C for 16 hours; The optimal sealing solution is 10% skim milk powder; The optimal sealing condition is to seal at 4°C for 12 hours; The optimal dilution ratio of ELISA secondary antibody is 1:15,000; The optimal substrate reaction time is 10 minutes. The intra board and inter board repeated coefficient of variation of this method are both below 10%, indicating that the ELISA method has good reproducibility. The established ELISA method showed no cross reactivity with positive serum samples of PPV,

PRV, PRRSV, African swine fever virus (ASFV), and PCV2; The conformity rate between this method and the neutralization test is 78.57%, and the conformity rate with the commercial reagent kit (for detecting E2 protein antibodies) is 84.67%.

In summary, 12 strains of CSFV were isolated in this study, including 11 strains with subtype 2.1 and 1 strain with subtype 2.2, indicating that the prevalent strains in China are still dominated by subtype 2.1; The most representative strain was selected as the parent sequence to express the Erns protein, and 5 Erns monoclonal antibodies were prepared. Two monoclonal antibodies were used to establish an indirect immunofluorescence method for distinguishing and detecting CSFV vaccines and wild viruses; A preliminary indirect ELISA method for detecting E^{Erns} antibodies was established using purified E^{Erns} protein expression, which can be used as a matching detection reagent for the E2 subunit vaccine of swine fever in clinical samples.

Keywords: Swine fever virus, E^{Erns} protein, Monoclonal antibodies, Indirect ELISA

1 前言

1.1 猪瘟概述

猪瘟最早被称猪霍乱，认为是由细菌导致的疫病，1903 年，美国科学家 Alexander deSchwernitz 和 Marion Dorset 推翻了之前普遍认为是细菌的说法，通过 6 年的研究证明猪瘟的病原体是病毒（Moennig *et al.*, 2013）。我国在 2008 年将猪瘟列为“一类动物疫病”，2022 年 6 月，农业农村部把猪瘟由“一类”调整为“二类”动物疫病。猪瘟在全球范围内分布，在大多数亚洲、中美洲、南美和东欧国家以及一些加勒比和非洲国家流行。偶尔也会在一些中欧和西欧国家发生（王琴等，2015）。1833 年，美国首次暴发了猪瘟，此后猪瘟在全球范围内广泛传播（SHOPE, 1958）。有关中国猪瘟的起源没有确切记载，但是东南大学于 1925 年开始研制免疫血清防治该病（周泰冲，1980），1945 年在石家庄分离出了石门毒株。猪瘟一经暴发会对养猪业造成严重的经济损失，传染性极强。猪感染发病后，可通过粪便、尿液、唾液、分泌物等排毒，进而对饮水、饲料和畜舍造成污染，还有一些昆虫也可能会通过叮咬病猪或解除污染饲料等成为猪瘟病毒的携带者，并通过接触等方式传给其他健康猪，病毒经传播感染进入猪体内后，病毒主要会在扁桃体内迅速复制增殖，然后经淋巴管，进入淋巴系统后继续增殖，随外周血液进入体内的各组织器官，也可从母体通过胎盘向后代垂直传播，造成流产或产生木乃伊胎（Dewulf *et al.*, 2001）。我国于上世纪 50 年代成功研制猪瘟兔化弱毒疫苗（仇华吉等，2005），该疫苗安全、有效，为我国乃至全球猪瘟有效防控发挥了巨大作用，有效地控制了该病，但散发流行依旧在我国各地发生，目前该病还是影响我国养猪业发展的主要障碍之一。

1.2 CSFV 的形态结构及理化特性

CSFV 属于黄病毒科（Flaviviridae）瘟病毒属（Pestivirus）。其粒子形态呈球形，直径比较均匀，常为 40~60 nm，有一层厚约 7 nm 的囊膜，内含二十面体对称的核衣壳，直径约 30 nm（叶文华，2024）。电镜下观察 CSFV 粒子的形态结构与其他瘟病毒完全一样，它们的电镜形态结构和模式图如图 1 所示。

高温可将病毒灭活，56°C 60 min 可将 CSFV 灭活，60°C 10min 使其完全丧失致病力。CSFV 不耐酸碱，pH 在 5~10 稳定，pH 在 3 条件下病毒滴度迅速下降，50°C 条件下 MgCl₂ 对病毒没有稳定作用（殷震等，1997）。乙醚、氯仿、脱氧胆盐酸和皂角素等可使其迅速失活。流体静压力和紫外线也对 CSFV 的感染性有影响，当二者联合应用时，可以灭活 CSFV（Freitas *et al.*, 2003）。

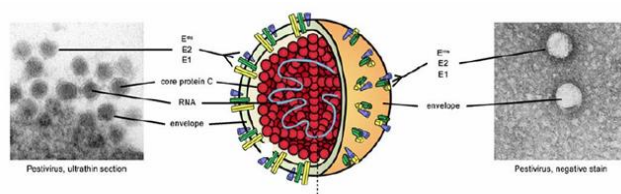


图 1 瘟病毒粒子的电镜形态及病毒粒子模式图（Beer *et al.*, 2007）

Fig.1 Electron microscopic morphology of plague virus particles and pattern of virus particles（Beer *et al.*, 2007）

1.3 CSFV 的基因组结构

CSFV 是基因组长度约 12.3 kb 的单股正链 RNA 病毒，由 5'UTR-开放阅读框（ORF）-3'UTR 组成，其中开放阅读框（ORF）编码一个大的多聚蛋白，这个大多聚蛋白经过病毒自身的作用，以及和宿主细胞的酶影响，形成 12 种病毒蛋白（庞会宁，2021），包括 4 个成熟的结构蛋白（C、E^{ms}、E1、E2）以及 8 个非结构蛋白（N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B），各蛋白的排列顺序从 N 端到 C 端其结构如图 2 所示。N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 属于非结构蛋白（许保疆，2009），其中 NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 是病毒复制中必需的，其余 3 种蛋白在病毒复制中非必需，而在 4 种结构蛋白中，E^{ms} 和 E2 是主要的保护性抗原，参与病毒感染以及诱导机体产生保护性抗体，除此之外，非结构蛋白 NS3 也能够诱导机体产生保护性抗体（宋香朋等，2022）。

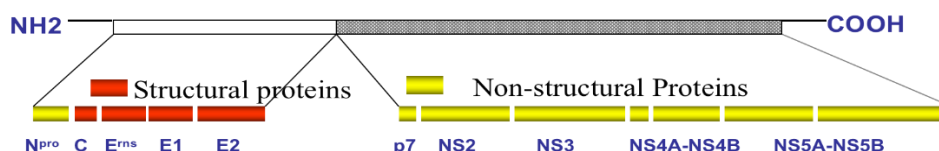


图 2 CSFV 基因组编码蛋白模式图（Beer *et al.*, 2007）

Fig.2 Patterns of encoded proteins in the CSFV genome（Beer *et al.*, 2007）

1.4 CSFV 分子遗传进化

由于病毒主要是由蛋白质和核酸两部分组成，因此，目前病毒的鉴定方法主要有血清分型和基因分型两种。虽然 CSFV 毒株与不同单抗的反应类型不完全相同，但是只有一个血清型，同时还会与其他瘟病毒有明显的抗原交叉反应。目前主要通过基因分型对 CSFV 进行遗传进化研究，根据国内外发表的有关 CSFV 基因多态性和分子遗传进化研究资料的数据，主要是以 5'UTR、E2、和 NS5B 基因序列对 CSFV 进行基因分型（高洋根，2016）。无论以哪一段基因序列进行基因分型，最终都将 CSFV 分成了 3 个基因型，10 个基因亚型（Yang, 2000），其中基因 1 型可再分为 3 个亚型，其主要由 20 世纪八九十年代亚洲和南美洲的分离毒株组成（Pereda *et al.*, 2005），我国的猪瘟疫化弱毒疫苗株，经典强毒石门株以及低温致弱疫苗株 Thiveral 株均属于 1.1 亚型；基因 2 型可再分为 3 个亚型，其中 2.1 和 2.2 亚型是我国目前流行毒株的主要基因型（王琴等，2006）；基因 3 型可再分为 4 个亚型，主要由 20 世纪九十年代在韩国、泰国和中国台湾发现的一些独特毒株构成。随着 CSFV 基因分型研究的深入，许多学者发现有些 CSFV 流行毒株可在基因亚型基础上进一步划分为多个亚亚型。中国台湾学者将 1996-2001 年分离的 CSFV 2.1 基因亚型进一步划分为 2.1a 和 2.1b 两个亚亚型（Deng *et al.*, 2005），而后又分为了 2.1c, 2.1d, 2.1e 等多种亚亚型。

1.5 CSFV 的检测方法

目前猪瘟常用的检测方法主要包括：病毒的分离、血清学方法及分子生物学检测等方法（李菲等，2010）。

1.5.1 CSFV 的分离

病毒分离技术仍是实验室检测与鉴定中常用的标准方法，CSFV 分离可以通过在敏感细胞上接种疑似猪瘟病料的组织悬液、全血等进行分离，应用最广泛适宜培养 CSFV 的敏感细胞是 PK-15 细胞。但由于 CSFV 在细胞培养过程中不产生细胞病变反应（CPE），在细胞培养中增殖的病毒一般使用较多的是通过间接免疫荧光（IFA）检测（包菲，2018）。

1.5.2 CSFV 血清学检测方法

由于我国猪瘟疫疫苗的免疫覆盖率高，因此血清学检测方法主要适用于未免疫过猪瘟疫疫苗的国家或地区。该方法主要通过检测血清中 CSFV 特异性抗体进而判断病毒的感染情况。在我国主要采用抗体检测进行疫苗的免疫效果评价。血清学检测主要包括：病毒中和试验法（Neutralization Test）、酶联免疫吸附实验（Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA）等。目前，ELISA 检测方法因其具有快速、敏感、简便、易于标准化和规模化等优点，使其成为猪瘟疫抗体检测的主要方法（张璞等，2022）。目前我国已经批准上市的检测猪瘟疫抗体的 ELISA 试剂盒有间接 ELISA 试剂盒，阻断 ELISA 试剂盒以及竞争 ELISA 试剂盒。根据检测原理的差异，不同的检测产品具有不同的特点和应用范围。

间接 ELISA 是以抗原抗体的特异性结合反应、酶与底物的显色放大反应原理为基础，将 CSFV 抗原吸附于酶标板上，加入待检血清后孵育一定时间，若待检血清中含有 CSFV 抗体，将特异性地吸附在酶标板表面的 CSFV 抗原形成抗原抗体复合物，再加上酶标记的二抗，该二抗与 CSFV 抗原抗体复合物结合，加入底物后，底物在酶的催化作用下发生反应，产生有色物质来判定（Voller *et al.*, 1975）。待检血清中抗体含量越高，催化反应后的颜色越深，反之颜色越浅。采用基因工程表达抗原 E2 蛋白研发的 CSFV 间接 ELISA 抗体试剂盒能够更加全面地反应血清中的抗体水平（徐璐等，2012），因此比较适合用于猪瘟疫疫苗免疫普及率较高的地区进行抗体大范围监测使用。

阻断 ELISA 的原理是将 CSFV 抗原包被于酶标板上加入待检血清后孵育一定时间，洗涤未结合的待检血清，再加入酶标记的猪瘟疫单克隆抗体反应后洗涤，除去未结合酶标抗体，加入底物后，底物在酶的催化作用下发生反应，产生有色物质。如果待检血清中有特异性的抗体，则会与包被抗原结合，封闭特异性的位点，使酶标单克隆抗体无法结合到酶标板上，则不会出现颜色反应，反之会出现颜色反应，待检血清中抗体含量越少，颜色越深，抗体含量越多，颜色越浅（蔺露等，2015）。因此阻断 ELISA 反应后体系的 OD 值与待检血清中 CSFV 抗体分子含量成反比。由于阻断 ELISA 采用了单克隆抗体，因此对检测的特异性更强，不会出现与 BVDV 之间的交叉反应，因此更适用于我国的规模化种猪场的监测。

竞争 ELISA 与阻断 ELISA 的原理相近，都采用了单克隆抗体，但操作更为简便，

也是目前广泛应用的一种商品化试剂盒。

1.5.3 CSFV 分子生物学检测方法

对猪瘟病毒的核酸检测是我国进行猪瘟确诊的主要方法，主要包括聚合酶链式反应 PCR 和实时荧光定量 PCR 技术，DNA 测序技术等（申秋平等，2023）。我国猪瘟诊断发布了 5 个国家标准，其中 2 个为病毒核酸的检测国标，分别为 RT-PCR 方法和 RT-nPCR 方法，这两种方法也是目前应用最为广泛的检测方法。

1.6 CSF 的防控措施

在中国，猪瘟防控一直坚持“预防为主”的方针。猪瘟疫苗接种是预防和控制该病最主要且最有效的方法，猪瘟疫苗 C 株是目前国际上公认的最有效的猪瘟弱毒疫苗，安全性高，免疫效力强，能对所有基因型毒株产生完全保护（Schulz *et al.*, 2017）。但由于 C 株疫苗为活疫苗，无法对疫苗免疫和野毒感染进行有效的鉴别，为我国实现非免疫净化的目标带来了一定的限制。因此，这种情况下研发具有鉴别能力的新型疫苗就成了实现猪瘟净化必经之路。

由于猪瘟病毒疫苗依靠体液免疫对猪产生坚强的保护，因此亚单位疫苗的研发具有一定的优势。E2 蛋白是猪瘟病毒的主要保护性抗原，是开发基因工程 CSFV 疫苗的靶抗原（Zhang *et al.*, 2018）。我国已有多个猪瘟 E2 亚单位疫苗产品上市。由于亚单位疫苗只会产生针对 E2 蛋白的抗体，不会产生对 E^{ms} 蛋白抗体，因此可以用于免疫与感染的鉴别诊断。E2 亚单位疫苗的这种鉴别优势尤其适用于种猪场及有净化需求的养殖企业，因此，用于 E2 亚单位疫苗鉴别的 E^{ms} 抗体检测试剂盒的研发就成了研究热点。

1.7 CSFV 抗原表位与单克隆抗体研究

CSFV 的主要抗原表位主要分布于结构蛋白 E^{ms} 和 E2 和非结构蛋白 NS3（孙永芳等，2017）。

E2 蛋白是猪瘟病毒的主要抗原蛋白，能刺激机体产生具有中和活性的保护性抗体。因此，针对 E2 蛋白的单克隆抗体研究是主要的研究方向。目前应用较为广泛的针对 E2

蛋白的单克隆抗体为 1990 年英国 AHVLA 实验室制备的 WH303 单抗, 经过前期研究表明, 单抗 WH303 与所有 CSFV 分离株均发生反应, 而与同属的牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和边界病毒 (BDV) 不存在交叉反应 (Edwards *et al.*, 1990), 在此基础上, Lin 等 (Lin *et al.*, 2000) 通过基因缺失突变的方法发现单抗 WH303 针对 CSFV 的一个线性 B 细胞抗原表位 ⁸²⁹TAVSPTTLR⁸³⁷, 该表位在 CSFV 高度保守, 而同属的 BVDV 和 BDV 则没有这一表位, 说明该单抗所识别的表位为 CSFV 病毒特异性表位, 能够将 CSFV 与同属瘟病毒进行鉴别诊断及表位。Wensvoort 通过实验证实 CSFV E2 有 4 个抗原结构域, 分别为 A、B、C 和 D, 其中 A、B 和 C 含有中和表位 (Wensvoort *et al.*, 1989)。后经 van Rijn 等的研究又将 A 抗原结构域分为 A1、A2 和 A3 三个亚结构域, 且证实只有 A1 能产生中和抗体 (van Rijn *et al.*, 1993)。Huang 等使用重组表达的抗原结构域和 E2 突变体以及重叠的肽库对 7 种单克隆抗体进行表位定位, 识别糖蛋白 E2 的 D/A 结构域上的位点。在 E2 的 D/A 结构域内鉴定出三个 CSFV 特异性表位, 即 780~794aa、810~824aa 和 846~850aa。定点突变进一步证实, 残基 783~785aa、789~794aa、813~824aa 和 846~848aa 是这些区域的关键残基。结构建模显示, 这三个表位彼此靠近, 表明它们可能在体内 D/A 结构域上形成更复杂的构象表位。其中 6 种单克隆抗体中和了不同基因型的病毒, 表明靶表位参与了病毒与细胞的相互作用。使用包含 D/A 结构域的截短 E2 蛋白或靶向结构域 D/A 的 CSFV 特异性单克隆抗体预孵育后, CSFV 与细胞的结合显著降低。在 D/A 结构域上鉴定的这些表位是病毒中和的重要靶标, 可能参与 CSFV 感染的早期步骤 (Huang *et al.*, 2023)。

E^{ms} 蛋白是 CSFV 的另一个免疫糖蛋白。Langeduk 等在 CSFV E^{ms} 蛋白 C 端 (191~227aa) 处发现了一个抗原表位, 该表位具有鉴别 CSFV、BVDV、BDV 的功能 (Langedijk *et al.*, 2001)。Lin 等通过表达 E^{ms} 截断的多种多肽, 进行 Western Blot 检测, 最终鉴定出三个重叠的抗原区域: AR1 (65~145aa), AR2 (84~160aa) 和 AR3 (109~220aa) 能够与猪瘟阳性血清特异性结合, 推测这三个抗原区的表位优势较大 (Lin *et al.*, 2004)。米士江筛选了 4 株 E^{ms} 单抗, 其中 1 株能与所有 CSFV 毒株发生反应, 但是与不同毒株的反应性强弱不同, 其余 3 株只能与 HCLV 株反应, 不与其他毒株

反应,说明 E^{ms} 具有保守抗原位点的同时还有细微抗原结构的差异,他筛选的 4 株单抗均为构象表位,这表明大多数的 E^{ms} 抗原表位是构象表位,因此准确解析抗原表位仍需要与蛋白结构相关技术相结合(米士江, 2022)。到目前为止,人们对 E^{ms} 蛋白的抗原表位研究较少,目前对于 E^{ms} 还有很多未知机制。

NS3 蛋白中含有瘟病毒群特异性抗原表位,因而 NS3 抗体特异性较低 (Brown *et al.*, 2002), 无法进行鉴别诊断。常天明等制备了 2 株针对 CSFV NS3 蛋白的单抗,初步分析表明,这两株单抗能同时识别 CSFV 和 BVDV, 为建立瘟病毒通用检测方法建立了基础(常天明等, 2010)。

1.8 CSFV 单抗及其在猪瘟诊断中的应用

CSFV 与同属的 BVDV、BDV 基因组序列同源性较高,在血清学上有明显的交叉反应,而 BVDV 和 BDV 也可以感染猪,因此这给猪瘟的鉴别诊断带来了困难。单抗具有高度的特异性和敏感性,能够识别病毒抗原的单一表位,因此利用 CSFV 单抗可以建立区分瘟病毒属各成员的诊断方法(李娇等, 2011)。作为检验试剂还可以使抗原抗体之间的特异性反应大大提高,并在鉴定过程中,减少了交叉反应,使试验结果可信度大大提高。目前 CSFV 单抗应用最多的便是 ELISA 检测 CSFV 抗体以及 IFA 检测 CSFV 抗原,国内外已经获批上市了多个阻断 ELISA E2 抗体检测试剂盒,其中以 IDEXX 公司的猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒最受欢迎,成为许多建立 CSFV ELISA 方法的符合率检验标准。梁冰冰等采用酶标记猪瘟 E2 单抗作为竞争性抗体,建立猪瘟竞争 ELISA 方法来测定猪瘟中和抗体。该方法的原理类似于 IDEXX 阻断 ELISA 试剂盒的原理,与 IDEXX 公司的猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒符合率达 85%。两种方法测得的相关性很高。该方法与中和试验的一致性也高,可以确定免疫后抗体的中和度。因此,可用于预先确定疫苗的有效性,也可用于大量样品的试验和流行病学监测。(梁冰冰等, 2008)。

1.9 研究的目的及意义

猪瘟是一种高度传染性疫病,在我国为二类动物疫病。猪瘟 C 株弱毒疫苗的广泛

应用有效的控制了猪瘟的流行，使我国实现猪瘟净化成为可能。但目前现有的 C 株弱毒疫苗与猪瘟野毒感染无法进行鉴别诊断，极大的限制了猪瘟净化的进程。因此，可鉴别的猪瘟疫苗的推广是未来猪瘟净化的必由之路。猪瘟 E2 亚单位疫苗是我国目前获批的唯一一种能进行疫苗免疫与野毒感染鉴别的猪瘟疫苗产品，但用于其配套检测的商品化 E^{ms} 检测试剂盒却仍是空白。

基于以上背景，本研究拟通过对猪瘟国内流行株的分离，进行遗传演化分析，选出优势毒株后表达 E^{ms} 蛋白，筛选 E^{ms} 单克隆抗体，建立一套检测猪瘟病毒 E^{ms} 抗原和抗体检测方法。通过方法的建立和应用，有助于猪瘟 E2 亚单位疫苗的大规模推广，对我国最终实现猪瘟全面净化具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 CSFV 组织样本

2022~2023 年, 从广西、四川、湖北、河南、河北、辽宁等 53 个养殖场、屠宰场及农贸市场采集了 691 份猪组织样品 (扁桃体、淋巴结、脾脏), 364 份猪全血样品, 以及接收规模化猪场送检样本 79 份, 共计 1134 份样品。

2.1.2 实验动物、毒株及细胞系

5~6 周龄 BALB/c 小鼠和 6~8 月龄 BALB/c 经产母鼠: 购自北京维通利华实验动物有限公司;

猪瘟病毒 C 株 (疫苗株), 猪瘟病毒石门株 (SM): 由中国兽医药品监察所国家/WOAH 猪瘟参考实验室提供; 分离的 CSFV 野毒株保存在中国兽医药品监察所国家/WOAH 猪瘟参考实验室 (生物安全 III 级实验室);

PK-15 细胞系、SF9 昆虫细胞、骨髓瘤细胞 SP2/0 由由中国兽医药品监察所国家/WOAH 猪瘟参考实验室提供。

2.1.3 实验场所

猪瘟病毒分离的所有操作在中国兽医药品监察所大兴基地生物安全 III 级实验室进行; 小鼠试验的所有操作均在中国兽医药品监察所大兴基地生物安全 II 级动物实验室进行; 其余所有试验操作均在中国兽医药品监察所国家/WOAH 猪瘟参考实验室 (生物安全 II 级) 进行。

2.1.4 主要试剂

本研究中所使用的主要试剂见下表 1。

表 1 主要试剂耗材

Table 1 Main Reagent Consumables

试剂耗材	生产厂家
Reagent consumables	Manufacturer
PBS 磷酸盐缓存液	HyClone
5×PrimeScript RT Master Mix	Takara
2× Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
核酸电泳琼脂糖	北京擎科生物科技股份有限公司
核酸凝胶染色剂	北京博迈德基因技术有限公司
DNA marker	Takara
<i>Bam</i> HI限制性内切酶	New England Biolabs
<i>Xho</i> I限制性内切酶	New England Biolabs
E.coli DH5α Competent Cells	上海生工生物工程股份有限公司
柱式质粒小提试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
DH10Bac 感受态细胞	北京索莱宝科技有限公司
Endo-Free BAC/PAC DNA Kit 试剂盒	Omega
Sf-900IISFM 培养基	Gibco
ExpiFectamine Sf 转染试剂	Gibco
Anti-His Tag Monoclonal Antibody	北京索莱宝科技有限公司
FITC 标记山羊抗小鼠 IgG（L+H）	Sigma
RIPA 裂解液（强）	上海碧云天生物技术股份有限公司
NuPAGE SDS Running Buffer（20×）	Thermo Fisher
NuPAGE Transfer Buffer（20×）	Thermo Fisher
NuPAGE LDS Sample Buffer（4×）	Thermo Fisher
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher
彩虹 180 广谱蛋白 marker	北京索莱宝科技有限公司
20×TBST 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（L+H）	北京索莱宝科技有限公司
QuickBlue 快速染胶液	北京博奥龙免疫技术有限公司
NI-TED 6FF 预装重力柱	BBI
Amicon Ultra 超滤管	Millipore
弗氏完全佐剂	Sigma
弗氏不完全佐剂	Sigma
MEM 培养基	Gibco
DMEM 培养基	Gibco
胎牛血清（FBS）	Sigma
50×HAT 选择培养基	Sigma
50×HT 选择培养基	Sigma
聚乙二醇（PEG）	Sigma

DMSO	Sigma
脱脂奶粉	BD
ELISA 反应板	Thermo Fisher
血清稀释板	Biofit
HRP 兔抗猪 IgG	Sigma
TMB 显色液	北京博奥龙免疫技术有限公司
终止液	北京博奥龙免疫技术有限公司
猪瘟 E2 蛋白单克隆抗体	中国兽医药品监察所
猪瘟病毒阳性血清	中国兽医药品监察所

2.1.5 主要实验仪器

本研究中所使用的主要实验仪器见下表 2。

表 2 主要实验仪器

Table 2 Main Experimental Instruments

仪器名称 Instrument name	生产厂家 Manufacturer
组织研磨仪	Biospec
冷冻高速离心机	Sigma
核酸提取仪	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
实时荧光 PCR 仪	Roche
PCR 仪	Biometra
生物安全柜	LabGard
电泳仪和电泳槽	北京君意东方电泳设备有限公司
凝胶成像仪	analytikjena
蛋白电泳仪	Thermo Fisher
超灵敏多功能成像仪	Cytiva
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Fisher
台式 pH 计	Thermo Fisher
酶标仪	NioTek

2.1.6 主要试剂配制

(1) 1%琼脂糖凝胶:先用量筒量取 100 mL 1×TAE 溶液,加入锥形瓶中,再在天平上称取 1 g 琼脂糖,加入锥形瓶中,放入微波炉加热溶化完全,再加入 10 μL 核酸染色剂混合均匀,倒入模具中。

(2) LB 培养基:在天平上依次称取 5 g 胰蛋白胨; 2.5 g 酵母提取物; 5 g NaCl 加入

到锥形瓶中,最后加入适量纯水定容至 500 mL,高压灭菌冷却后,4℃储存。固体培养基则在原来配方上加入 7.5 g 琼脂粉。

(3) 转座筛选用 LB 固体培养基:在 LB 固体培养基配制时,温度下降至 55℃左右迅速加入卡那霉素 50 μg/mL,庆大霉素 7 μg/mL,四环素 10 μg/mL, X-gal 100 μg/mL 和 IPTG 40 μg/mL,各成份混匀后,在每块平板中倒入 20 mL 培养基,待凝固后放置 4℃备用。

(4) 20 mM 咪唑洗脱液:称取 20 mM 的十二水合磷酸钠 (7.60 g), 0.5 mM 氯化钠 (29.25 g), 20mM 咪唑 (1.36 g), 用纯水定容至 950 mL, 调 pH 值于 7.4, 最后定容至 1 L。

(5) 60 mM 咪唑洗脱液:称取 20 mM 的十二水合磷酸钠 (7.60g), 0.5 mM 氯化钠 (29.25 g), 60mM 咪唑 (4.08 g), 用纯水定容至 950 mL, 调 pH 值于 7.4, 最后定容至 1 L。

(6) 100 mM 咪唑洗脱液:称取 20 mM 的十二水合磷酸钠 (7.60 g), 0.5 mM 氯化钠 (29.25 g), 100 mM 咪唑 (6.80 g), 用纯水定容至 950 mL, 调 pH 值于 7.4, 最后定容至 1 L。

(7) 200 mM 咪唑洗脱液:称取 20 mM 的十二水合磷酸钠 (7.60 g), 0.5 mM 氯化钠 (29.25 g), 200 mM 咪唑 (13.62 g), 用纯水定容至 950 mL, 调 pH 值于 7.4, 最后定容至 1 L。

(8) 500 mM 咪唑洗脱液:称取 20 mM 的十二水合磷酸钠 (7.60 g), 0.5 mM 氯化钠 (29.25 g), 500 mM 咪唑 (34.04 g), 用纯水定容至 950 mL, 调 pH 值于 7.4, 最后定容至 1 L。

(9) 1×电泳液:量取 50 mL 20×NuPAGE SDS Running Buffer 液,加入瓶中,然后量取 950 mL 纯水混合均匀。

(10) 1×转膜液:量取 50 mL 20×NuPAGE Transfer Buffer 液,加入瓶中,然后量取 950 mL 纯水混合均匀。

(11) 1×TBST:量取 50 mL 20×TBST 缓冲液液,加入瓶中,然后量取 950 mL 纯水

混合均匀。

(12) 1×PBST: 将 2 L PBS 缓冲液加入 1 mL Tween20 溶液。

(13) 封闭液: 称取 1 g 脱脂奶粉, 加入 20 mL TBST 缓冲液充分溶解。

(14) PK-15 细胞培养基: 94% MEM 培养基, 5%胎牛血清 (FBS), 1%青链霉素 (双抗)。

(15) Sp2/0 细胞培养基: 79% DMEM 培养基, 20%胎牛血清 (FBS), 1%青链霉素 (双抗)。

(16) 1×HAT 选择培养基: 用 10 mL DMEM 培养基将 50×HAT 选择培养基粉末溶解均匀后取 2 mL, 加入到 98 mL sp2/0 细胞培养基中。

(17) 1×HT 选择培养基: 用 10 mL DMEM 培养基将 50×HT 选择培养基粉末溶解均匀后取 2 mL, 加入到 98 mL sp2/0 细胞培养基中。

2.1.7 生物信息学软件

BLAST 比对 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);

序列比对及系统进化分析软件: DNASTar 软件包, MEGA-X, SnapGene;

在线预测网站 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), 在线表位预测工具 alphafold (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>);

建立间接 ELISA 方法所使用软件: EXCEL, SPSS, GraphPad Prism。

2.2 方法

2.2.1 CSFV 流行株的分离

2.2.1.1 样品的处理

将组织剪取 1 g 大小的组织小块，放置于无菌离心管中，先用无菌剪刀将组织尽量剪碎，再向其中加入 1 mL 无菌 PBS 缓冲液和研磨钢珠，置于匀浆机中匀浆，将匀浆液于 4℃ 温度下 8,000 rpm 离心 5 min，取上清置于另一个无菌离心管中，做好标记，待检。

2.2.1.2 样品核酸提取

采用磁珠法自动核酸提取仪提取，按照试剂盒说明书进行核酸提取，取出核酸提取反应板，上下翻转几次，撕开铝膜，向 A1-H1 和 A7-H7 孔位依次加入 400 μL 待测样品，上机。结束后用移液器吸取 A6-H6 和 A12-12 孔位中的液体到 200 μL 离心管中。

2.2.1.3 实时荧光 RT-PCR 检测

2.2.1.3.1 反转录为 cDNA

将提取的 RNA 用反转录酶进行反转录，体系为：RNA 8 μL，5×Primescript RT Master Mix 2 μL；反应条件为 37℃ 15 min；85℃ 10 s，反转录得到的 cDNA 可 4℃ 短暂保存或者 -20℃ 保存备用。

2.2.1.3.2 实时荧光 PCR 检测

参考国家标准《猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法》（GBT 27540-2011）的引物序列合成引物（见表 3），同时设置阳性和阴性对照。阳性对照中加入 3 μL 猪瘟 C 株病毒 cDNA，阴性对照加入 3 μL 无核酸灭菌水，反应体系见表 4。

表 3 实时荧光 PCR 引物

Table 3 Real time fluorescent PCR primers

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence
上游引物 F	5-TACAGGACAGTCGTCAGTAGTTCGA-3
下游引物 R	5-CCGCTAGGGTTAAGGTGTGTCT-3
探针 P	5-FAM-CCCACCTCGAGATGCTATGTGGACGA-TAMRA-3

表 4 实时荧光 PCR 反应体系

Table 4 Real time fluorescence PCR reaction system

体系组份	体积 (μL)
System components	Volume(μL)
上游引物 F(10 μmol/L)	1
下游引物 R(10 μmol/L)	1
探针 P(10 μmol/L)	0.8
HyperProbe Mixture 预混液	10
无核酸灭菌水	4.2
待检 cDNA/阳性/阴性对照	3
Total	20

荧光定量 PCR 扩增程序：95℃，30 s；95℃，10 s；58℃，20 s，反应 45 个循环。

判断标准：阴性：无 Ct 值并且无典型的扩增曲线。阳性：Ct 值 ≤ 34，且出现典型的扩增曲线。可疑：Ct 值 > 34，且出现典型扩增曲线的样本。

2.2.1.4 病毒分离

将检测结果为阳性的样品悬液用 0.22 μm 滤器过滤除菌，接种于长至 6 孔细胞板的 70~80%密度的 PK-15 细胞，每孔加入 500 μL，37℃孵育 1 h 后每孔补加维持液 3 mL，放入 37℃，5% CO₂ 恒温培养箱培养 72 h 后反复冻融三次后收取毒液。依此方法盲传 3 代。并且选择 C 株做阳性对照，未接毒细胞做阴性对照做相同处理。

使用间接免疫荧光方法鉴定病毒在细胞上是否繁殖成功，阳性对照和阴性对照也同样操作。弃去病毒液于消毒水中，将细胞用预冷的固定液（50%甲醇+50%丙酮）固定，-20℃放置 30 min 以上。弃去固定液，PBS 漂洗 1 次。加入 500 倍稀释的猪瘟病毒 E2 蛋白单抗，37℃反应 1 h。PBS 漂洗 3 次。加入 500 倍稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗，37℃反应 45 min。PBS 漂洗 3 次，荧光显微镜下观察荧光。

2.2.1.5 E2 基因和 E^{rms} 基因的扩增和测序

随后参照 2.2.1.2 的核酸提取方法及 2.2.1.3.1 中 RNA 反转录方法，对 P3 代细胞上清提取核酸并且将 RNA 反转录为 cDNA。参考文献（彭志成等，2014）合成 E2 引物以扩增 E2 基因片段，参考文献（米士江，2018）合成 E^{rms} 引物来扩增 E^{rms} 基因片段。引物序列见表 5，反应体系见表 6。

表 5 扩增猪瘟疫病毒 E^{rms} 基因和 E2 基因的引物信息Table 5 Primer information for amplifying the E^{rms} and E2 genes of swine fever virus

基因 gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增长度 Amplified length
E2	CSFV-E2-F	5-GGYRAATATGTGTGTGTWAGACC-3	1519bp
	CSFV-E2-R	5-TGGTCTTRACTGGRTTGTTTGTC-3	
E ^{rms}	CSFV-E ^{rms} -F	5-GAACAAACCACCRGAGTCCAG-3	819bp
	CSFV-E ^{rms} -R	TACCATATGTACCCTAYYTTCC	

用 CSFV-E2-F 和 CSFV-E2-R 为上游、下游引物扩增 E2 基因；以 CSFV-E^{rms}-F 和 CSFV-E^{rms}-R 为上游、下游引物，按照下表配制 PCR 体系。

表 6 E2 基因和 E^{rms} 基因扩增反应体系Table 6 E2 gene and E^{rms} gene amplification reaction system

体系组份 System components	体积 (μL) Volume(μL)
CSFV-E2/E ^{rms} -F	1
CSFV-E2/E ^{rms} -R	1
2× Phanta Max Master Mix	25
ddH ₂ O	20
cDNA	3
Total	50

PCR 程序：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 15 s；55℃ 退火 15 s，72℃ 延伸 2 min，进行 35 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 结束后将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳观察结果，将条带大小符合预期的 PCR 产物送至生工生物工程有限公司进行测序分析。

2.2.1.6 测序结果分析

使用 NCBI 在线功能 Blast 检索高度同源的基因片段为参考，使用 MEGA-X 软件根据 E2 基因和 E^{ms} 基因构建系统发育进化树。使用 DNASTar 进行氨基酸同源性比对。

2.2.2 CSFV E^{ms} 蛋白的真核表达

2.2.2.1 重组杆状质粒的构建及验证

选择分离的流行株中氨基酸同源性最高的 E^{ms} 基因，在其 N 端加入信号肽（图 3），构建 pFastBacHT B-E^{ms} 质粒交由生工生物工程有限公司优化密码子后合成。质粒图谱如图 4。

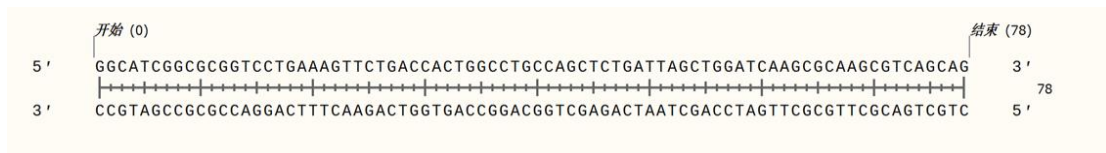


图 3 蜂素肽 DNA 序列

Fig.3 Bee peptide DNA sequence

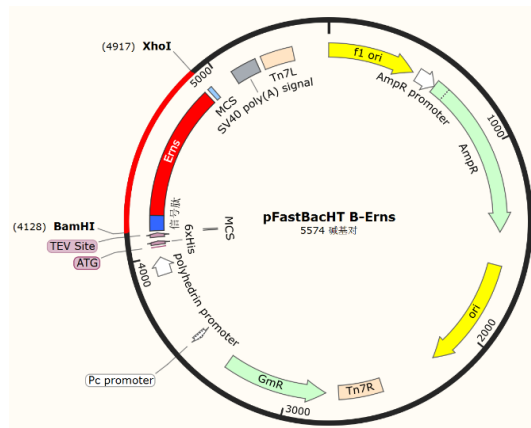


图 4 pFastBacHT B-E^{ms} 质粒图谱

Fig.4 pFastBacHT B-E^{ms} plasmid map

将公司合成的质粒菌液取 50 μ L 加入到呈有 5 mL 的 Amp 抗性的 LB 液体培养基的摇菌管中进行摇菌，在 37 $^{\circ}$ C 摇床中 200 rpm 培养 8 h，待菌液的 OD₆₀₀ 吸光值达到 0.8~1.0 时，使用质粒小提试剂盒进行质粒提取，将提取的质粒使用 *Bam*HI 和 *Xho*I 限制性内切酶对重组质粒进行双酶切验证（酶切体系见表 7，酶切条件为：37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h），核酸

电泳观察结果，双酶切验证正确的质粒进行后续试验。

表 7 双酶切体系

Table 7 Double enzyme digestion system

体系组份 System components	体积 (μL) Volume(μL)
<i>Bam</i> HI	1
<i>Xho</i> I	1
10×buffer	5
ddH ₂ O	35
pFastBacHT B-E ^{rms}	8
Total	50

2.2.2.3 重组杆状质粒的真核表达

(1) 重组杆状质粒的转座

将 10 μL 重组杆状质粒 pFastBacHT B-E^{rms} 缓慢加入 DH10Bac 感受态细胞中，冰上静置 30 min；之后在 42℃ 水浴锅中热激 90 s，再放冰上静置 2 min，加入 890 μL 无抗 LB 培养基，于 37℃ 温度下，200 rpm 摇床培养 4 h。收集菌液，再次用 LB 培养基进行 10 倍梯度稀释，分别稀释为 10⁻¹，10⁻² 和 10⁻³ 三个稀释度，各取 100 μL 的菌液涂布到转座筛选的 LB 固体培养基上，倒置平板，37℃ 培养 24~48h。

随机挑取白色单菌落在平板上进行二次划线培养，进行复筛，37℃ 温箱培养 24~48h，挑取白色菌落于含 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环霉素的 5 mL LB 液体培养基中，37℃ 摇床中 200 rpm 培养 16 h 以上。

参照文献（黄允真，2019）合成 M13 通用引物（见表 8），对摇混的菌液用 M13 通用引物进行扩增，验证重组杆粒是否成功转座，其反应体系与反应程序同 2.2.1.5。

表 8 M13 引物序列

Table 8 M13 Primer Sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
M13-F	5-AGGGTTTTCACGTCACG-3
M13-R	5- GAGCGGATAACAATTCACAC-3

(2) 重组杆粒的提取

使用 Endo-Free BAC/PAC DNA Kit 试剂盒提取质粒，可以提取高拷贝数的重组 Bacmid 质粒，碱性-SDS 溶液裂解细菌，释放菌体中的 DNA，使用 HiBind 结合柱纯化质粒 DNA，最后用 ddH₂O 洗脱 DNA。

(3) 重组杆粒的转染及重组杆状病毒收获

重组 Bacmid 质粒提完之后，要尽快转染，不可放于-20℃保存或者长时间保存于4℃。按照 ExpiFectamine Sf 转染试剂说明书进行转染操作，步骤如下：

使用 Sf-900IIISFM 培养基，在 6 孔板中以 1×10^6 个细胞/孔铺 SF9 细胞，每孔 3 mL，在 27℃培养箱静置 1 h。

将 10 μ L 转染试剂，加入到 250 μ L opti-MEM 无血清培养基中，室温孵育 5 min。将 1 μ g 重组 Bacmid 质粒加入稀释好的转染试剂中，室温孵育 10 min。之后将孵育好的混合物直接滴进铺好的 SF9 细胞中。在 27℃环境下培养 72~96 h 后，收集细胞上清，记为 P0 代病毒液。

收集 P0 代病毒液离心，经 0.22 μ m 滤器过滤后，再次接种到 6 孔细胞板中 1×10^6 个细胞/孔的 SF9 细胞，在 27℃培养箱静置 1 h。在 27℃环境下培养 72~96 h，记为 P1 代。

2.2.2.4 CSFV E^{ms} 蛋白的表达验证

(1) IFA 检测蛋白表达

收集转染 72 h 后的 p1 代细胞上清，将 6 孔板中的细胞用预冷的固定液（50%甲醇+50%丙酮）固定，2 mL/well，-20℃放置 30 min 以上。弃去固定液，PBS 漂洗 1 次。加入 500 倍用含 3%马血清 PBS 稀释的 His 单抗，1 mL/well，37℃反应 1 h。PBS 漂洗 3 次。加入 500 倍用含 3%马血清 PBS 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗，1 mL/well，37℃反应 45 min。PBS 漂洗 3 次，观察荧光。

(2) SDS-PAGE 检测蛋白表达

将 P1 代病毒液按照上述方法连续传代 2 次至 P3 代。收集 P3 代 SF9 细胞上清，同时用 PBS 清洗细胞两次，并用 PBS 将细胞吹下来在 4℃条件下 5,000 rpm 离心 10 min，弃掉上清，用 RIPA(强)在冰上裂解细胞沉淀 10 min，12,000 rpm 离心 10 min，收集上清；同时收集未接毒 SF9 病毒上清与细胞裂解产物做空白对照。取 P3 代细胞上清，细

胞悬液以及空白对照组的样品各 60 μ L, 加入 20 μ L 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀, 煮沸 10 min, 取 10 μ L 加入到凝胶凹形样品槽内, 保持 120 v 恒压开始跑胶, 待溴酚蓝标记移动到凝胶底部时, 取出凝胶, 将凝胶置于 QuickBlue 快速染胶液中振荡 2 h, 取出放于纯水中脱色, 观察。

(3) Western Blot 检测蛋白表达

方法同 SDS-PAGE 检测蛋白表达, 待电泳结束后, 采用湿转的方式进行转膜, 按照 NC 膜在正极, 凝胶在负极的原则, 在转膜仪中保持 200 mA 恒流转膜 1 h, 取下 NC 膜, 加入 5%脱脂奶粉过夜封闭; TBST 洗膜 5 遍, 加入 1:200 倍 TBST 稀释的猪瘟疫病毒阳性血清, 室温轻轻振荡孵育 2 h; TBST 洗膜 5 遍, 加入 1:10,000 倍 TBST 稀释的 HRP 标记的兔抗猪二抗, 室温轻轻振荡孵育 1 h; PBST 洗膜 5 遍, 用显影液显影。

2.2.2.5 CSFV E^{rns} 蛋白的纯化

用 P2 代重组杆状病毒液按照 1/100 的体积接种 SF9 细胞, 72 h 后收集细胞, 将细胞悬液, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 10,000rpm 离心 10 min, 弃掉上清, 用 RIPA(强)在冰上裂解细胞沉淀 10 min, 之后再用超声破碎仪超声破碎 2 min, 直至液体开始变得清澈, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 10,000rpm 离心 10 min, 取上清用 0.45 μ m 滤器过滤后, 用 5 mL Ni-TED 6FF 预装重力柱进行亲和层析纯化, 操作步骤如下:

(1) 平衡: 用 5~10 倍柱体积纯水清洗树脂后, 再用 5~10 倍柱体积 20 mM 咪唑结合缓冲液平衡介质, 保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。

(2) 上样: 将蛋白原液加入到纯化柱与树脂结合。

(3) 洗杂: 使用 5~10 倍柱体积的 20 mM 咪唑淋洗, 清洗非特异性吸附的杂蛋白, 收集留下来的液体用于后续分析。

(4) 洗脱: 用 5~10 倍柱体积的 60 mM 咪唑, 100 mM 咪唑, 200 mM 咪唑, 500 mM 咪唑分别淋洗, 分别收集留下来的液体用于后续分析。

(5) 再生: 用 5~10 倍柱体积纯化水清洗树脂介质, 去除介质中洗脱液。

将不同咪唑浓度的洗脱液进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析, 确定最适洗脱浓度。

2.2.2.6 蛋白的脱盐与浓缩

收集含有目的蛋白的各收集管，使用 Millipore 公司的 Amicon Ultra 超滤管对初步纯化后的样品进行脱盐与浓缩。4,000 g 离心将超滤管中的纯水和分子量较小的盐类物质弃掉，时间不应调太久，应多次离心，及时观察浓缩液情况。

2.2.3 CSFV E^{rns} 单克隆抗体的制备及鉴定

2.2.3.1 免疫小鼠

选择 5 只 5~6 周龄 SPF 雌性 BALB/c 小鼠，首次免疫将纯化的 E^{rns} 蛋白 60 µg/只与弗氏完全佐剂 1:1 等比例混匀，皮下注射；免疫 14 天后，按照 60 µg/只免疫的剂量与弗氏不完全佐剂 1:1 等比例混匀，皮下注射进行二次免疫；三次免疫在二次免疫后 14 天，同样按照 60 µg/只免疫的剂量与弗氏不完全佐剂 1:1 等比例混匀，皮下注射。

2.2.3.2 小鼠抗体水平间接 ELISA 检测

(1) 抗原包被：使用 pH 为 9.6 的 0.05 mM 碳酸氢钠缓冲液稀释纯化的 E^{rns} 蛋白，包被稀释后终浓度为 0.5 µg/mL 的 E^{rns} 蛋白到酶标板中，4℃ 过夜。

(2) 封闭：次日弃去板内液体，用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 5% 脱脂奶粉 300 µL，37℃ 封闭 2 h。

(3) 加一抗：弃去板内液体，用 PBST 洗板 3 次，对三免 14 天后的小鼠进行尾静脉采血，同样采取一只未免疫鼠血清做阴性对照，用 PBS 进行 10 倍梯度稀释，共稀释 8 个梯度。每孔加入 100 µL 稀释好的小鼠血清，37℃ 孵育 2 h。

(4) 加二抗：弃去板内液体，用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 µL 用 PBS 进行 20,000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗，37℃ 孵育 1 h。

(5) 显色：弃去板内液体，用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 µL TMB 显色液，37℃ 避光孵育 10 min 后每孔加入 50 µL 终止液。

(6) 结果判定：读取 OD₄₅₀，以 OD 值大于 1.0 为标准，当免疫血清效价达 10,000 倍以上时，取小鼠脾脏，与 SP2/0 细胞进行融合。若效价未达此标准，按上述方法进行

加强免疫一次。

2.2.3.3 饲养细胞的制备

融合前一天，制备 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养层细胞。操作如下：

(1) 取 7~8 周龄 BALB/c 小鼠脱颈椎处死，于 75% 酒精浸泡消毒 5 min。

(2) 手术剪将腹部剪开一个小口，用 10 mL 针管将预冷的 DMEM 培养基注入腹腔内，并用手按摩小鼠腹腔，抽出培养基到离心管中。

(3) 1,000 rpm 离心 10 min，弃上清，用所需体积的含 HAT 完全培养基重悬，并按照 100 μ L/well 加入 96 孔板。

(4) 置于 37°C，含 5% 的 CO₂ 细胞培养箱培养备用。

2.2.3.4 细胞融合

提前一周左右复苏骨髓瘤 sp2/0 细胞。融合当日，将 sp2/0 细胞用 DMEM 培养基从细胞瓶壁上吹下来，吸入到 50 mL 离心管中。

将小鼠摘眼球取血，然后脱颈处死，放入 75% 的酒精中浸泡 5 min。用剪刀和镊子取下小鼠的脾脏，放到细胞筛上，细胞筛放置在装有 DMEM 培养基的平皿中。用无菌研磨棒轻轻地将脾充分碾碎，使细胞滤过筛网，进入平皿中的 DMEM 培养基中，制成脾细胞悬液。将脾细胞悬液用细胞筛过滤 1 次，吸入到 50 mL 离心管中。

将 sp2/0 细胞悬液和脾细胞悬液在 25°C 温度下，1,000 rpm 离心 10 min，离心结束后弃上清，将两种细胞再次用 DMEM 培养基重悬。使用细胞计数板对两种细胞计数。将脾细胞与 sp2/0 细胞按 5~10:1 的数量比例进行混合，25°C，1,000 rpm 离心 10 min。

将离心后的细胞上清倒掉。轻柔拍打离心管底，使细胞成为细胞泥状。1 min 内缓慢加入 1 mL 预热的 PEG，边加边轻转离心管；1 min 内将细胞悬液吸进吸管，随后在吸管中静置 1 min；1 min 内缓慢将细胞吹到离心管中；1 min 内加入 1 mL 的无血清的 DMDM 培养基；1 min 左右缓慢加入 5 mL 无血清的 DMEM 培养基；5 min 内缓慢加入无血清 DMEM 培养基 20 mL。静置 10 min 后在 25°C 条件下 1,000 rpm 离心 10 min。

倒掉上清，加入 30 mL 完全培养基（含 1% HAT 和 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基）

重悬融合后的细胞，将融合的细胞加入到 3 个事先铺有饲养细胞的 96 孔板中，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 。

融合后 3 天后进行第一次半换液。每孔吸出 100 μL 培养基，随后补加 100 μL 完全培养基。7 天后采用不完全培养基（含 1%HT 和 20%胎牛血清的 DMEM 培养液）进行半换液，同时每天观察是否有杂交瘤细胞生成，待长出单个集落时，对细胞上清进行间接 ELISA 初筛，方法参照 2.2.3.2。选取细胞孔中出现明显的细胞集落，并且 OD 值高于 0.5 的阳性孔进行亚克隆。

2.2.3.5 亚克隆

亚克隆前一天，根据融合后阳性孔数量确定需要亚克隆的孔数。制备饲养细胞板。方法同 2.2.3.3。

用 200 μL 培养基将阳性孔细胞重悬，用培养液对细胞悬液进行 2 倍梯度稀释，显微镜下观察细胞密度，选择有 50~80 个细胞的稀释度，吸取所有细胞，重悬至 10 mL 培养液中，平均分散在预先铺有饲养细胞的 96 孔细胞板中，37°C 5% CO_2 培养箱中培养。亚克隆后 5~7 天开始观察，并对每孔的细胞团数量进行记录，待每个细胞团长至 1/4-1/5 孔底面积时，再次使用 ELISA 方法筛选。选择结果 OD 值较高且孔中只有 1 个细胞克隆的阳性孔进行扩大培养及第二轮亚克隆。亚克隆应进行 2~3 轮，以确保筛选的细胞全部为单克隆细胞。

2.2.3.6 杂交瘤细胞的扩大培养

待单个阳性杂交瘤细胞长成单细胞群落后，用含 20%血清浓度的 DMEM 培养基吹下转移到 24 孔板培养，待细胞基本长满整个孔时，再使用同样的方法转移到 6 孔板，之后再转移至 T25 细胞瓶。阳性杂交瘤细胞不能一直培养，培养时间过长可能会导致细胞不再分泌抗体。

2.2.3.7 杂交瘤细胞的冻存与复苏

冻存：将检测结果为阳性且培养状态良好的杂交瘤细胞进行冻存保种。弃去细胞培养上清，用无血清 DMEM 培养基对细胞进行重悬，取 10 μL 细胞悬液进行计数。按 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞密度用细胞冻存液（10%DMSO、40%FBS 胎牛血清、50%DMEM）将细

胞进行重悬，分装到冻存管，1 mL/管。装入细胞冻存盒中放入-80℃冰箱中进行程序降温，1 d后转移至液氮中长期保存。

复苏：液氮罐中取出冻存的细胞，迅速放入 37℃水浴锅中，并摇动使其迅速融化，将细胞悬液转移至 5mL DMEM 完全培养基中，1,000 rpm 离心 5 min，弃上清，用 5 mL 完全培养基重悬细胞至细胞培养瓶中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2.3.8 单克隆细胞亚类鉴定

使用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用 ELISA 试剂盒对单克隆细胞亚类进行鉴定，大致步骤如下：

(1) 将每株待测杂交瘤细胞上清各做 6 个孔，加入到酶标板中，每孔 100 μL，同时添加通用阳性对照和通用阴性对照，也是各加 6 孔，每孔 100 μL，37℃孵育 30 min。

(2) 弃去板内液体，洗板 5 次。在每株杂交瘤细胞上清的 6 个孔中分别加入 100 μL 6 种酶标二抗(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA)，通用阳性、阴性对照的同样操作，37℃孵育 30 min。

(3) 弃去板内液体，洗板 5 次。每孔分别加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μL，37℃避光显色 20 min。

(4) 每孔加入 50 μL 终止液，用酶标仪测定 OD₄₅₀，根据对应的酶标二抗查看单克隆细胞的亚型。

2.2.3.9 腹水的制备

选用 6~8 月龄健康经产 BALB/c 雌鼠。每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 无菌液体石蜡进行扩腹。扩腹 14 d 后，每只小鼠腹腔注射 1×10⁶ 细胞/mL 的杂交瘤细胞，每只注射 0.5 mL。待小鼠腹部膨大且有波动感时，用注射器吸取腹水。将采集的腹水于 3,000 rpm 离心 10 min，取上清，使用 AKTA 机器，Protein G 亲和层析柱进行腹水纯化，纯化后做间接 ELISA 进行效价测定。

2.2.3.10 单抗反应谱鉴定

将分离的 11 株猪瘟流行株（除 IVDC-HuB-04 之外）与实验室保存到疫苗 C 株和

SM 株于 PK-15 细胞, 72 h 后用固定液固定细胞, 用筛选的单克隆抗体进行间接免疫荧光, 用于鉴定单抗与其他猪瘟病毒的反应。方法同 2.2.2.4 (1)。

2.2.3.11 单抗特异性鉴定

将猪细小病毒 (PPV), 猪伪狂犬病毒 (PRV), 猪圆环病毒 2 型接种于 PK-15 细胞, PRRSV 病毒接种于 Marc-145 细胞, 72 h 后用固定液固定细胞, 用筛选的单克隆抗体进行间接免疫荧光, 用于鉴定单抗与其他猪源病毒的交叉反应性。方法同 2.2.2.4(1)。

2.2.3.12 单抗与 Western Blot 反应鉴定

表达的 E^{ms} 蛋白作为蛋白样品, 5 种单抗和免疫小鼠阳性血清分别孵育作为一抗, 具体方法同 2.2.2.4(3)。

2.2.3.13 单抗中和活性鉴定

(1) 细胞的准备: 预先 18~24h 制备细胞, 将 PK-15 细胞均匀铺在 96 孔细胞培养板中, 待细胞长至 70~80% 铺满孔底时, 进行下列操作。

(2) 病毒的稀释: 根据预先测定的 CSF 病毒毒价, 将病毒稀释至 100 TCID₅₀/50 μ L。

(3) 抗体的稀释: 将纯化后的单克隆抗体从 100 倍开始进行 2 倍梯度稀释, 每个稀释度 150 μ L。将稀释后的单抗中加入等量病毒毒液, 充分混匀。将混合后的单抗—病毒混合板置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。

(4) 加入混合液: 取预先长至 70~80% 单层的 PK-15 细胞板, 吸出培养基, 加入抗体—病毒混合液, 100 μ L/well, 每个浓度单抗重复 2 孔。

(5) 病毒的回滴定: 将稀释至 100TCID₅₀/50 μ L 的病毒液再次进行 10 倍梯度稀释, 接种长至 70~80% 单层的 PK-15 细胞, 每个稀释度接做 6 个重复。置于 37℃ 含 5% CO₂ 温箱中孵育 1 h 后, 每孔补加 100 μ L 维持液。置于 37℃ 含 5% CO₂ 温箱中培养 72 h。

(6) 染色: 细胞培养 72 h 后弃去细胞培养液, 用固定液固定细胞, 做间接免疫荧光观察, 方法参照 2.2.2.4(1)。同时计算病毒回滴定结果, 当病毒回滴定结果为 30~300 TCID₅₀/100 μ L 时, 试验成立。

2.2.3.14 CSFV E^{rns} 单抗阻断效果鉴定

(1) 单抗的 HRP 标记：纯化后的 5 株单克隆抗体交由北京博奥龙免疫技术有限公司使用辣根过氧化物酶（HRP）进行偶联。

(2) E^{rns} 蛋白最适包被浓度和单抗最适反应浓度的确定：将包被抗原 E^{rns} 稀释为 5 μg/mL，然后 2 倍梯度稀释至 2.5 ng/mL 进行包被；封闭液使用 5%脱脂奶粉 37℃封闭 2 h；将单抗从 1:1,000 开始稀释，然后 2 倍梯度稀释至 1:128,000 进行 37℃孵育 1h；加入显色液显色 10 min，显色后结果判定：读取 OD₄₅₀，按照 P/N 大于 2.1 的标准判定，选择最佳蛋白包被浓度和单抗最佳反应浓度。

(3) 猪瘟疫阳性血清与 E^{rns} 蛋白的反应性研究：采用确定的最适蛋白浓度进行包被；封闭液使用 5%脱脂奶粉 37℃封闭 2h；将猪瘟疫阴阳性血清进行 2 倍稀释 37℃孵育 2h；加入 1: 20,000 倍稀释度 HRP 标记的兔抗猪 IgG 二抗，在 37℃条件下孵育 2h，显色后结果判定：读取 OD₄₅₀，按照 P/N 大于 2.1 的标准判定。

(4) 猪瘟疫阳性血清对单抗的阻断作用研究：采用确定的最佳浓度的 E^{rns} 蛋白，用 5%脱脂奶粉封闭，37℃封闭 2 h；将猪瘟疫阴阳性血清进行 2 倍稀释后加入，37℃孵育 2 h；加入 2.2.4.1.2 中确定的最佳单抗稀释倍数的 HRP 标记的单抗在 37℃条件下孵育 1 h；加入显色液显色，结果计算公式如下： $PI(\%) = [(\text{阴性血清 } OD_{450} \text{ 值} - \text{阳性血清 } OD_{450} \text{ 值}) / \text{阴性血清 } OD_{450} \text{ 值}] \times 100\%$ 。

(5) E^{rns} 蛋白的结构分析与表位预测：使用 alphafold 在线网站（<https://alphafold.ebi.ac.uk/>）根据氨基酸序列预测 E^{rns} 蛋白质结构，根据预测出的蛋白质结构使用在线预测工具（<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>）预测 B 细胞表位。

2.2.4 CSFV 间接免疫荧光方法的初步建立

根据单抗反应谱选择一种或多种单抗建立 CSFV 间接免疫荧光方法，固定液使用 50%甲醇+50%丙酮，固定时间 30 min，单抗稀释度为 200 倍，FITC 标记抗鼠二抗稀释度为 500 倍。具体方法同 2.2.2.4(1)。

2.2.5 CSFV E^{ms} 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.5.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的摸索

采用棋盘滴定法，将纯化的 E^{ms} 蛋白在酶标板上从左到右依次按照 5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.625 $\mu\text{g/mL}$ ……5 ng/mL 的浓度用包被液稀释，最后一列只加入包被液作为空白对照，每孔加入 100 μL ，贴上封板膜，放置 4℃冰箱过夜。次日用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 10%脱脂奶粉，37℃封闭 2 h。用 PBST 洗板 3 次，阳性标准血清和阴性标准血清从 50 倍开始分别进行 2 倍梯度稀释，最终稀释到 3,200 倍，最后一行只加入稀释液作为无血清对照，自上而下加入到酶标板中，每孔加入 100 μL ，37℃孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次，每孔加入 100 μL 20,000 倍稀释的兔抗猪酶标二抗，37℃反应 1 h。PBST 洗涤 3 次，每孔加入底物显色液 100 μL ，避光显色 10 min，每孔加入 50 μL 终止液，于 450 nm 处读取 OD 值，计算阳性对照与阴性对照比值(P/N)，比值最高的组对应的抗原浓度为抗原最佳包被浓度。

2.2.5.2 包被条件的摸索

分别选择 4℃包被 24 h、4℃包被 16 h、4℃包被 12 h、37℃包被 2 h 和 37℃包被 1 h 五个包被条件，以最佳包被浓度的蛋白浓度进行包被，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，10%脱脂奶粉封闭后，与阳性/阴性血清反应，选择阳性对照与阴性对照比值 (P/N) 最高的组的条件进行包被。

2.2.5.3 最佳封闭液的摸索

对比 3%脱脂奶粉、5%脱脂奶粉、10%脱脂奶粉、1%BSA 和 2%BSA 分别作为封闭液时的作用效果，封闭时间 2 h，根据与阳性血清和阴性血清反应后得到的阳 OD₄₅₀ 值，计算 P/N 值，阳性对照与阴性对照比值最高的组对应的封闭液为最佳封闭液。

2.2.5.4 最佳封闭条件的摸索

选择 2.2.5.3 最佳封闭液，设置比对 37℃孵育 1 h、37℃孵育 2 h、4℃封闭 12 h、4℃封闭 16 h 四种条件的封闭作用效果，与阳性/阴性血清反应后，得出阳性血清 OD₄₅₀

值和阴性血清 OD₄₅₀ 值，计算 P/N 值，阳性对照与阴性对照比值最高的组对应的封闭条件为最佳封闭条件。

2.2.5.5 最佳酶标抗体工作浓度的摸索

使用以上最佳条件，酶标抗体稀释度设置 1:5,000、1:10,000、1:15,000 和 1:20,000，与阳性血清和阴性血清反应，得出阳性血清 OD₄₅₀ 值和阴性血清 OD₄₅₀ 值，计算 P/N 值，阳性对照与阴性对照比值最高的组对应的稀释度为最佳酶标抗体稀释度。

2.2.5.6 底物反应时间的摸索

使用以上最佳条件，将底物溶液分别作用 5、10、15 和 20 min，比较阳性/阴性血清的 P/N 值，选择比值最高的反应时间作为显色时间。

2.2.5.7 重复性试验

对同一个包被的酶标板，使用优化后的 CSFV 间接 ELISA 检测方法检测 4 份阳性、4 份阴性血清，每份血清做 3 次重复，读取其 OD₄₅₀ 值，计算其板内变异系数；对不同包被的酶标板，使用优化后的 CSFV 间接 ELISA 检测方法检测，读取其 OD₄₅₀ 值，计算其板间变异系数。

2.2.5.8 临界值的确定

使用优化后的 CSFV E^{ms} 间接 ELISA 检测方法对经中和试验验证的猪 68 份血清，其中包括 30 份阴性血清和 38 份阳性血清，以优化的条件进行 ELISA 检测，读取 OD₄₅₀ 值，利用 SPSS 软件对所有血清的 OD 值进行数据分析以敏感性为纵坐标，1-特异性为横坐标，绘制 ROC 曲线，曲线上的每一个点代表一个临界值所对应的敏感性和特异性。计算每个临界值的 Youden 指数[Youden=敏感性- (1-特异性)，选择 Youden 指数最大的值作为临界值，并以此确定敏感性和特异性。

2.2.5.9 特异性试验

将 PRV、PPV、PCV2、PRRS、ASFV 及 CSFV 阳性血清进行相同倍数稀释，再使用优化后的 CSFV E^{ms} 间接 ELISA 检测方法进行检测，读取其 OD₄₅₀ 值，判断特异性。

2.2.5.10 符合性试验

使用优化后的 CSFV E^{ms} 间接 ELISA 检测方法和荧光抗体病毒中和试验（金标准方法）同时对 70 份猪瘟血清样本的血清进行检测，计算其符合性。

2.2.5.11 CSFV E^{ms} 间接 ELISA 抗体检测方法的应用

（1）使用优化后的 E^{ms} 间接 ELISA 方法对广西和四川等地采集的 300 份猪血清样品进行检测，采用 IDEXX 公司的猪瘟抗体检测试剂盒（检测 E2 抗体）进行比较，计算符合性。

（2）使用优化后的 E^{ms} 间接 ELISA 方法对 2 份 E2 亚单位疫苗免疫猪血清以及猪瘟疫苗免疫血清进行反应，判断其鉴别作用。

3 结果与分析

3.1 CSFV 流行株的分离

2022~2023 年，从广西、四川、湖北、河南、河北、辽宁等 53 个养殖场、屠宰场及农贸市场采集了 691 份猪组织样品（扁桃体、淋巴结、脾脏），364 份猪全血样品，以及接收规模化猪场送检样本 79 份，共 1134 份样品。通过实时荧光 RT-PCR 检测，共检测出 12 份猪瘟阳性样品，阳性率为 1.06%（12/1134）。其中在湖北地区采集的样品中检测出 6 份阳性样品；分别命名为:IVDC-HuB-01，IVDC-HuB-02，IVDC-HuB-03，IVDC-HuB-04，IVDC-HuB-05，IVDC-HuB-06；河南地区检测出 3 份阳性样品，分别命名为IVDC-HeN-01，IVDC-HeN-02；河北地区检测出 1 份阳性样品，命名为IVDC-HeB-01；辽宁地区检测出 1 份阳性样品，命名为 IVDC-LN-01。

将检测出的 12 份阳性样品在 PK-15 细胞上进行病毒分离，并使用猪瘟 E2 蛋白单抗抗体进行间接免疫荧光鉴定（IFA），12 株分离野毒的 IFA 结果见图 5 所示。

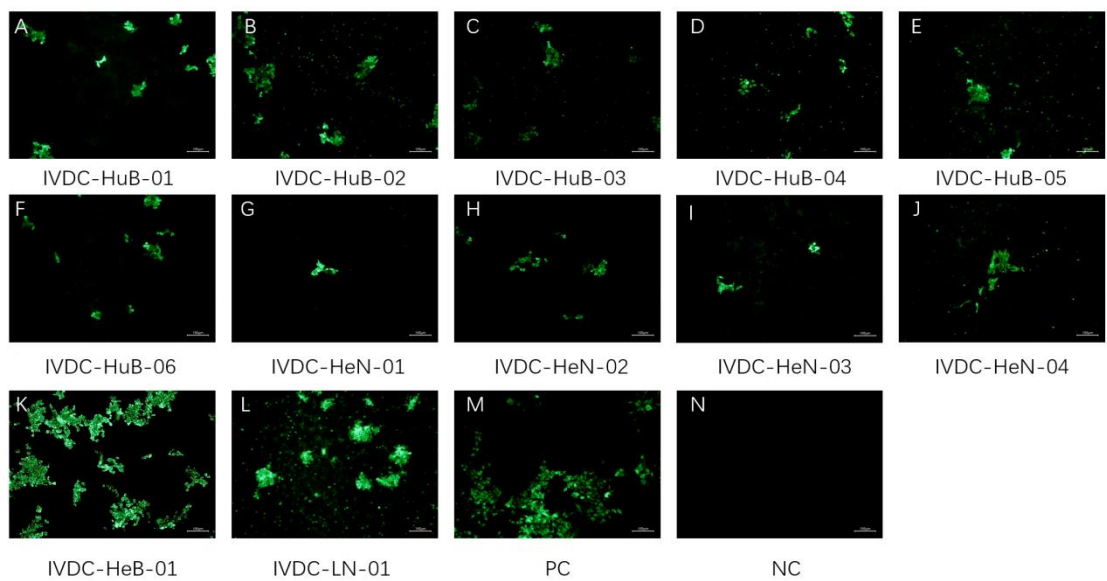


图 5 间接免疫荧光法鉴定猪瘟病毒感染

A-L:阳性样品毒株分离鉴定结果；M: C 株；N:未接毒细胞

Fig.5 Indirect immunofluorescence assay for identification of swine fever virus infection

A-L: Positive sample strain isolation and identification results; M: C strain; N: Untoxic cells

3.1.1 CSFV 流行株 E2 基因分析结果

使用 E2 基因引物对提取的分离株病毒核酸进行 RT-PCR 扩增，结果 12 个分离毒株均扩增出 1519 bp 的目的条带（图 6）。对阳性产物进行回收、测序，测序结果经 blast 比对，确认为 CSFV E2 序列，与参考毒株序列构建遗传进化树(图 7)，通过遗传进化树发现 83.3%属于 2.1b 亚亚型（10/12），8.3%属 2.1c 亚亚型（1/12），8.3%属于 2.2 亚型（1/12）。

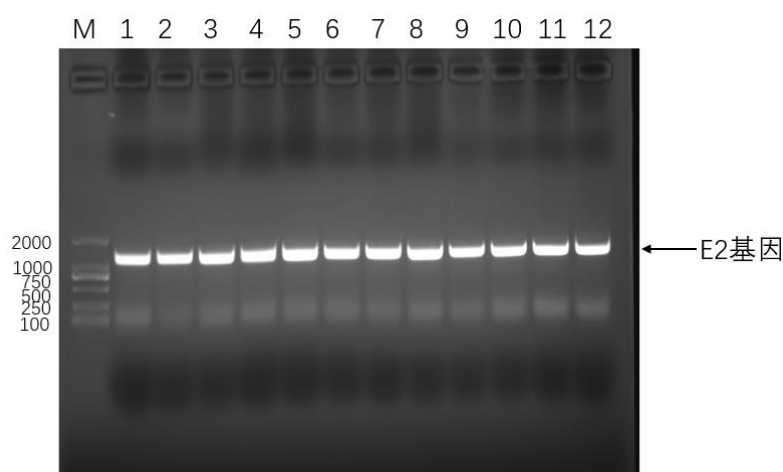


图 6 CSFV E2 全长基因扩增 PCR 产物的琼脂凝胶电泳分析

M: Marker; 1-12: 分离株样品编号

Fig.6 Agar gel electrophoresis analysis of CSFV E2 full-length gene amplification PCR product

M: Marker; 1-12: Sample number of isolated strains

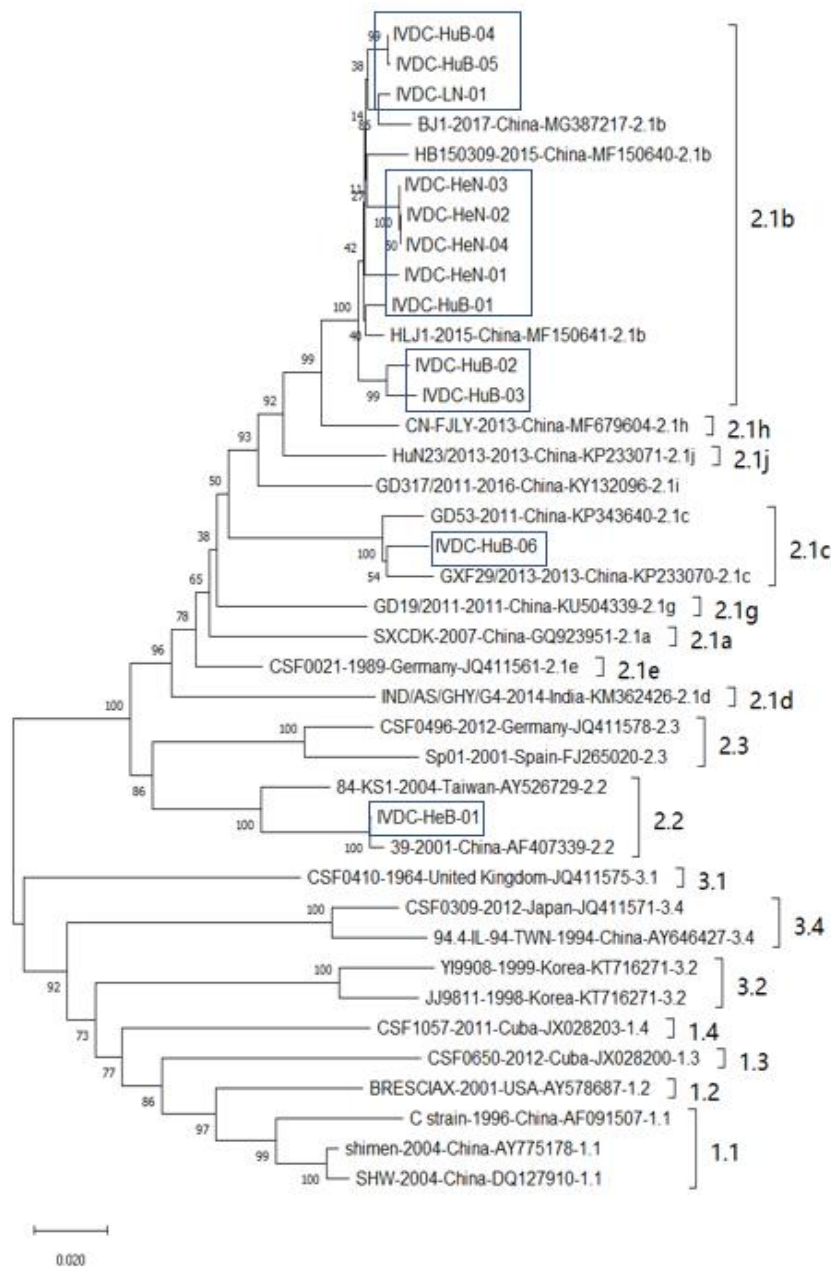


图 7 CSFV -E2 基因遗传进化树

Fig.7 Genetic Evolution Tree of CSFV E2 Genes

3.1.2 CSFV 流行株 E^{ms} 基因分析结果

使用 E^{ms} 基因引物对提取的分离株病毒核酸进行 RT-PCR 扩增，12 株分离毒株均扩增出 819 bp 目的条带（图 8），对阳性产物进行测序，并与参考毒株序列构建遗传进化树（图 9），通过遗传进化树发现 83.3%属于 2.1b 亚亚型（10/12），8.3%属 2.1c 亚亚型（1/12），8.3%属于 2.2 亚型（1/12），与 E2 基因分型结果相同。

CSFV E^{ms} 基因推导氨基酸序列作同源性比较分析（图 10），结果发现：IVDC-HuB-04 和 IVDC-HeN-03 的 E^{ms} 序列完全一致，且与其余 10 株毒株的氨基酸序列同源性和一致性最高，于是选择 IVDC-HuB-04 序列作为 E^{ms} 蛋白表达序列。

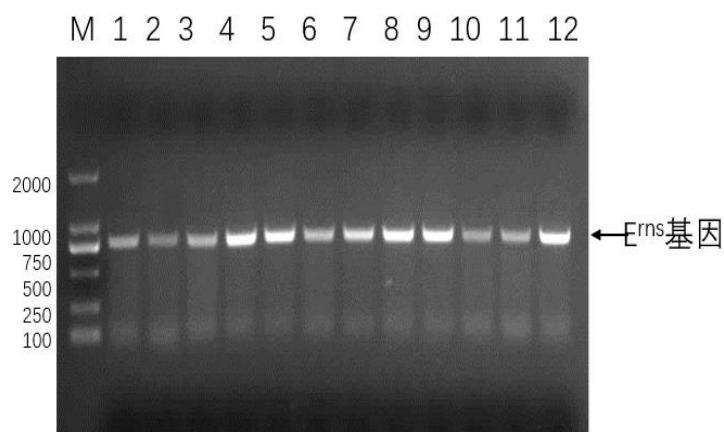


图 8 CSFV E^{ms} 全长基因扩增 PCR 产物的琼脂凝胶电泳分析

M:Marker; 1-12: 分离株样品编号

Fig.8 Agar gel electrophoresis analysis of CSFV E^{ms} full-length gene amplification PCR product

M: Marker; 1-12: Sample number of isolated strains

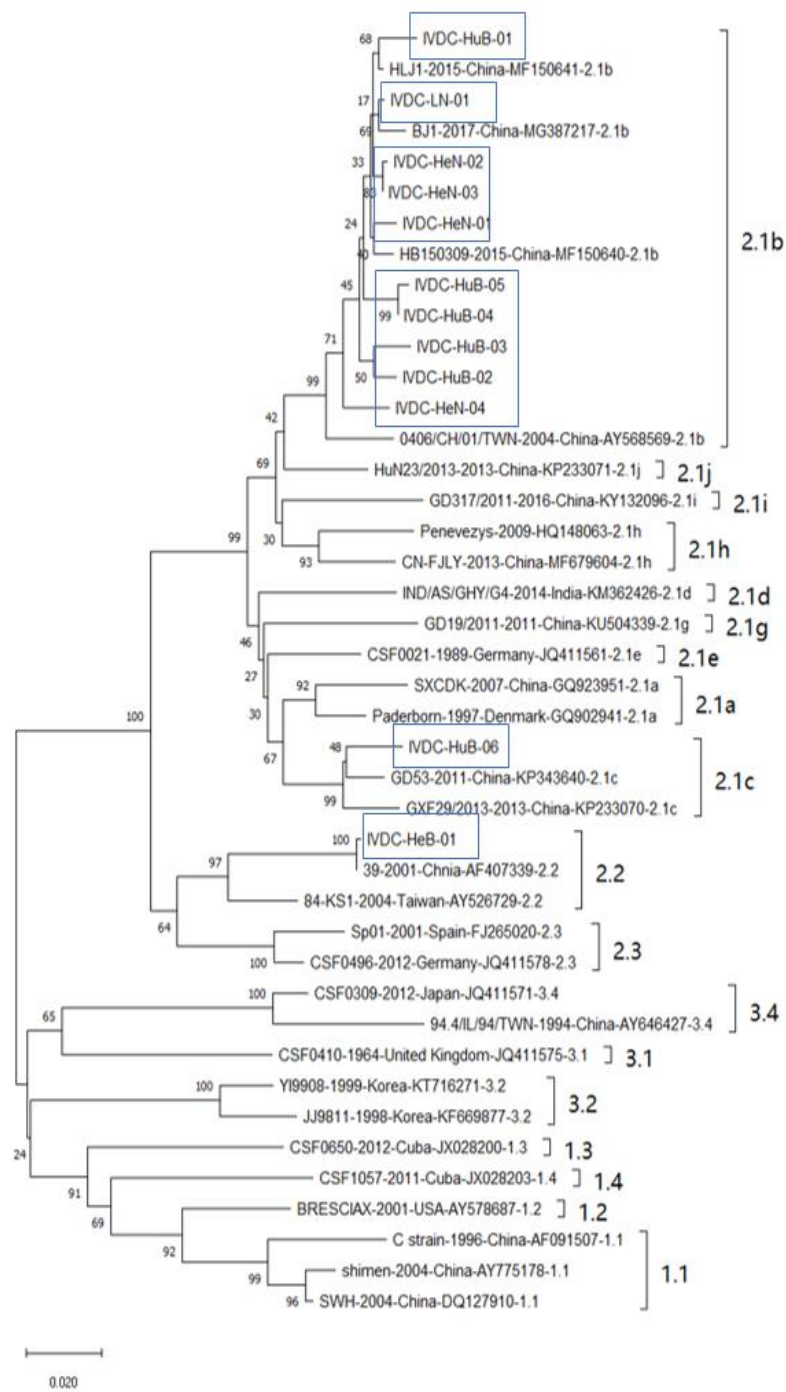


图 9 CSFV -E^{rns} 基因遗传进化树

Fig.9 Genetic Evolution Tree of CSFV E^{rns} Genes

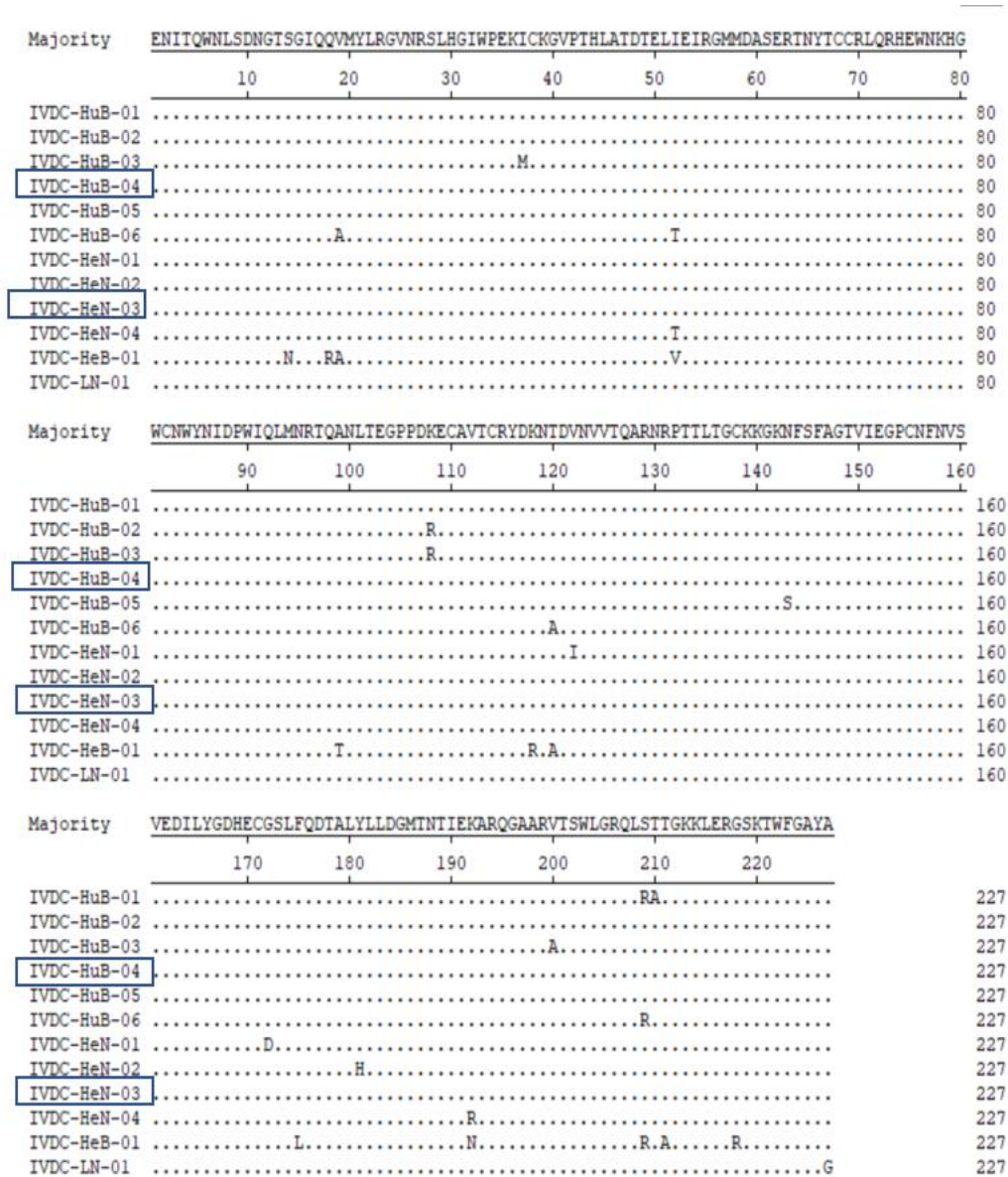


图 10 分离株 E^{rns}氨基酸同源性比较分析

Fig.10 Comparative analysis of amino acid homology among isolated E^{rns} strains

3.2 CSFV E^{rns}蛋白的真核表达

3.2.1 重组杆状质粒的酶切验证

将重组杆状质粒 pFastBacHT B-E^{rns} 进行 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切鉴定。结果证明，出现了约 5,000 bp 左右的载体条带以及还有约 795 bp 的 E^{rns} 目的基因条带，与预期相符，见图 11。

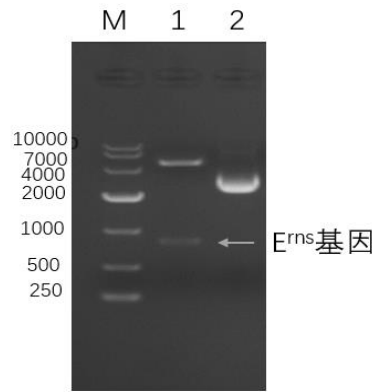


图 11 pFastBacHTB-E^{rns} 酶切结果

M:Marker; 1: pFastBacHT B-E^{rns} 酶切; 2.pFastBacHT B-E^{rns} 质粒未酶切

Fig.11 pFastBacHTB-E^{rns} enzyme digestion results

M:Marker;1:PFastBacHT B-E^{rns} enzyme digestion;2.pFastBacHT B-E^{rns} plasmid not cleaved

3.2.2 重组杆状质粒的转座验证

将鉴定正确的 pFastBacHT B-E^{rns} 重组质粒转化至 DH10Bac 感受态细胞中，质粒上的目的基因与 DH10Bac 菌体中的染色体发生转座，两轮蓝白板筛选后，挑取 3 个白色菌落克隆进行摇菌扩大培养。对菌液进行 PCR 验证，采用 M13 通用引物进行扩增，验证结果如图 12，Bacmid-E^{rns} 扩增产物约 3095 bp，与预期相符，表明重组杆粒构建成功。

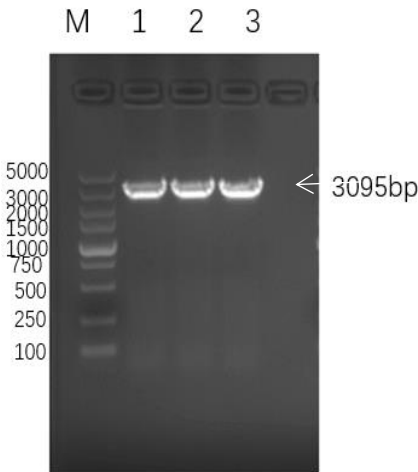


图 12 M13 引物菌液 PCR 结果

M: marker; 1-3: Bacmid-E^{rns}

Fig.12 PCR results of M13 primer bacterial solution

M: Marker;1-3:Bacmid-E^{rns}

3.2.3 重组杆状病毒的鉴定

将鉴定正确的重组杆粒转染 SF9 细胞，72 h 后获得 P0 代重组杆状病毒，将 P0 代病毒接种 SF9 细胞，收获细胞上清即为 P1 代毒种。将 P1 代细胞用固定液固定，采用 His 单克隆抗体对表达蛋白进行间接免疫荧光鉴定，证明接毒孔有特异性荧光，正常细胞对照孔无可见荧光，详见图 13。

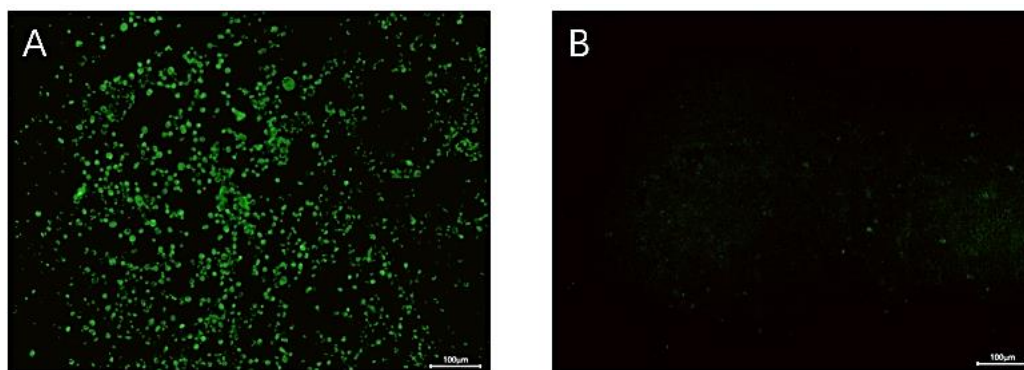


图 13 重组杆状 P1 代病毒在 SF9 细胞中的增殖

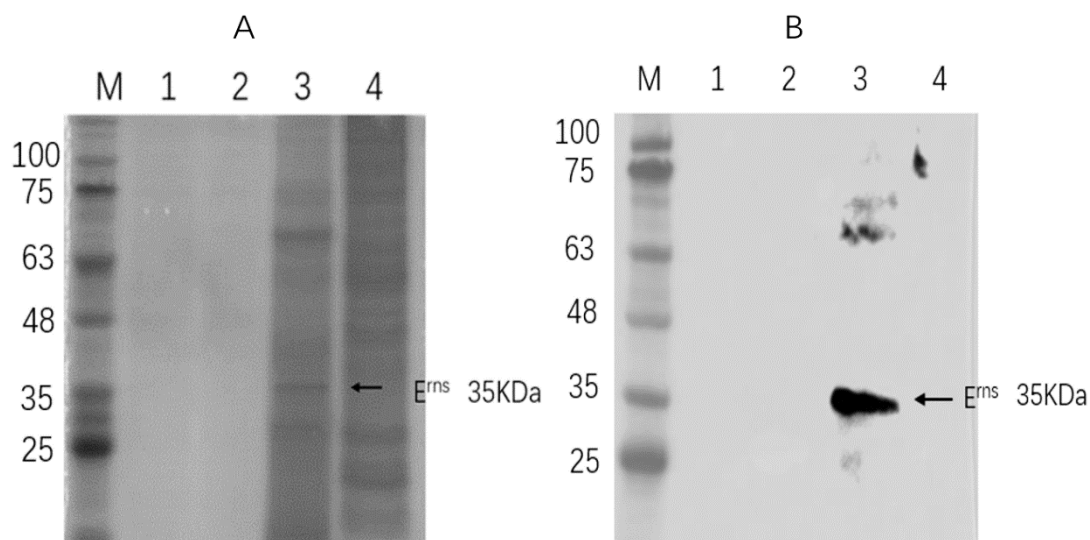
A: P1 代病毒感染 SF9 细胞 72h; B: 未接毒细胞对照

Fig.13 Proliferation of recombinant rod-shaped P1 generation virus in SF9 cells

A: P1 generation virus infects SF9 cells for 72 hours; B: Untoxic cell control

3.2.4 CSFV E^{rns} 蛋白表达性鉴定

将 P3 代重组杆状病毒感染 SF9 细胞 72 h 后，收获细胞上清，并且裂解细胞，与未感染的 SF9 细胞上清和细胞裂解物共同进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定（图 14）。结果显示，重组杆状病毒感染的细胞裂解物中出现大小约为 35 KDa 的目的条带，感染的上清中未出现目的条带，未感染的正常细胞和上清中无条带，表明重组杆状病毒表达的 E^{rns} 蛋白为胞内表达，并未分泌到细胞上清中。采用 His 单抗进行 Western Blot 鉴定，证明感染细胞裂解物中存在表达的目的蛋白。

图 14 CSFV E^{rns} 蛋白表达性鉴定

A: SDS-PAGE; B: Western Blot

M: marker; 1: P3 代病毒感染上清; 2: SF9 上清;

3: P3 代病毒感染细胞; 4: SF9 细胞

Fig.14 Identification of CSFV E^{rns} protein expression

A:SDS-PAGE; B:Western Blot

M: Marker; 1: P3 generation virus infection supernatant; 2: SF9 supernatant;

3: P3 generation virus infects cells; 4: SF9 cells

3.2.5 CSFV E^{rns} 蛋白的纯化

将 SF9 细胞进行悬浮培养, P3 代重组杆状病毒感染悬浮细胞 72 h 后, 离心收集细胞, 经裂解破碎细胞后, 收集离心上清, 用 5 mL Ni-TED 6FF 预装重力柱进行亲和层析纯化, 依次用不同浓度的咪唑溶液洗脱, 收集不同浓度的洗脱液进行 SDS-PAGE, 结果如图 15 所示, 当咪唑浓度小于 100 mM 时, 洗脱液中主要为杂质蛋白。当达到 100 mM 时, 目的蛋白可以被洗脱, 但杂质蛋白浓度仍较高。当咪唑浓度达到 200 mM 时, 洗脱的主要为 E^{rns} 蛋白, 杂质蛋白较少。因此, 将 200 mM 咪唑作为 E^{rns} 蛋白的洗脱浓度。收集目的蛋白采用超滤管进行浓缩以及脱盐处理后, 采用猪瘟高免阳性血清进行 Western Blot 验证, 如图 16, 结果在 35 KDa 处产生与目的条带, 证明表达的 E^{rns} 蛋白能够与猪瘟阳性血清发生特异性反应。

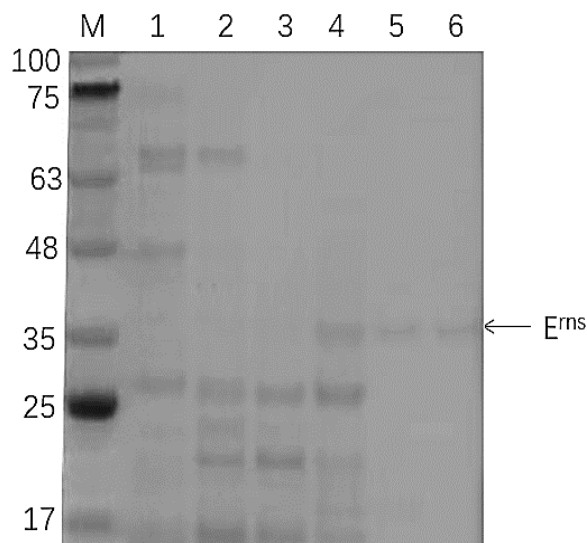


图 15 E^{rns} 蛋白纯化 SDS-PAGE 验证结果

M: 蛋白 marker; 1: 流穿; 2: 20 mM 咪唑洗杂液; 3: 60 mM 咪唑洗脱液;
4: 100 mM 咪唑洗脱液; 5: 200 mM 咪唑洗脱液; 6: 500 mM 咪唑洗脱液

Fig.15 SDS-PAGE validation results of E^{rns} protein purification

M: Protein marker; 1: Flowing through; 2: 20 mM imidazole detergent; 3: 60 mM imidazole eluent;
4: 100 mM imidazole eluent; 5: 200 mM imidazole eluent; 6: 500 mM imidazole eluent

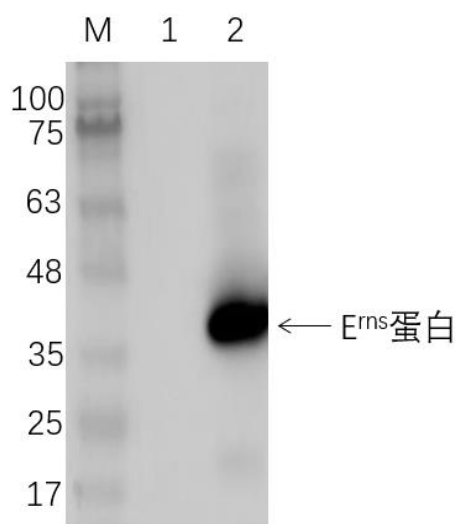


图 16 纯化 E^{rns} 蛋白 Western Blot 验证结果

M: 蛋白 marker; 1: 空载体转染裂解物; 2: 纯化 E^{rns} 蛋白

Fig.16 Western Blot validation results of purified E^{rns} protein

M: Protein marker; 1: Empty vector transfection lysate; 2: Purification of E^{rns} protein

3.3 CSFV E^{rns} 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

3.3.1 CSFV E^{rns} 蛋白单克隆抗体的制备

3.3.1.1 免疫小鼠血清效价检测

采用表达的 E^{rns} 蛋白，对免疫小鼠血清进行抗体效价测定，结果证明免疫小鼠均产生了较强的免疫反应，以 OD 值达到 1.0 为标准，抗体效价均可达到 12,800 倍以上，见图 17。

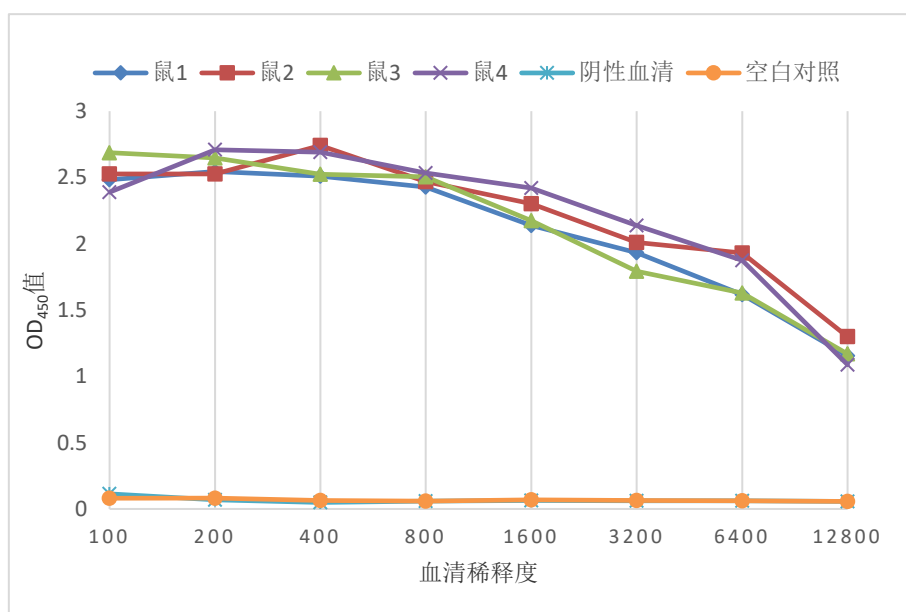


图 17 免疫小鼠血清 ELISA 测定结果

Fig.17 Immunoassay results of serum ELISA in immunized mice

3.3.1.2 杂交瘤细胞的初筛

采用建立的间接 ELISA 方法对融合后杂交瘤细胞进行初筛，测定 OD₄₅₀ 值，从中挑选了 10 株 OD₄₅₀ 高于 0.5 且细胞长势良好的阳性孔进行亚克隆，其 OD₄₅₀ 结果如图 18 所示。

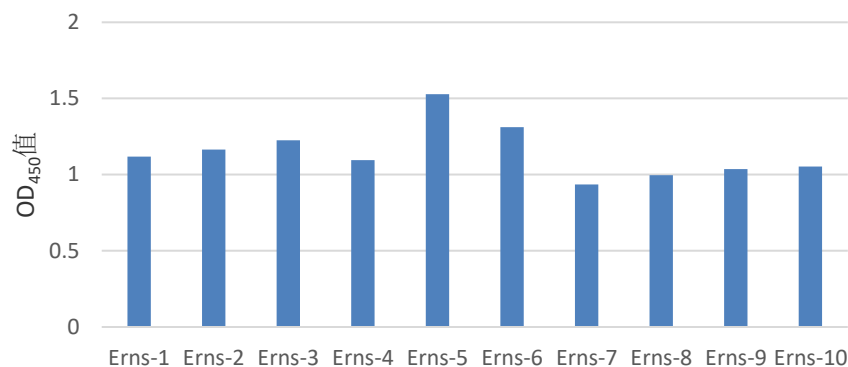


图 18 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株

Fig.18 ELISA screening of positive hybridoma cell lines

3.3.1.3 杂交瘤细胞的复筛

为了避免由于 E^{ms} 蛋白中的杂质造成的非特异性反应，采用分离的 IVDC-HuB-04 毒株感染的 PK-15 细胞进行间接免疫荧光检测，对初筛的 10 个原始孔杂交瘤细胞株进行复筛，对仍为阳性的孔进行亚克隆。结果经过 3 轮亚克隆后，共筛选到 5 株稳定分泌 E^{ms} 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 Mab- E^{ms} -1、Mab- E^{ms} -2、Mab- E^{ms} -3、Mab- E^{ms} -4、Mab- E^{ms} -5。如图 19 显示，所获得 5 株杂交瘤细胞株上清均能与 CSFV 特异性结合，出现了特异性荧光。

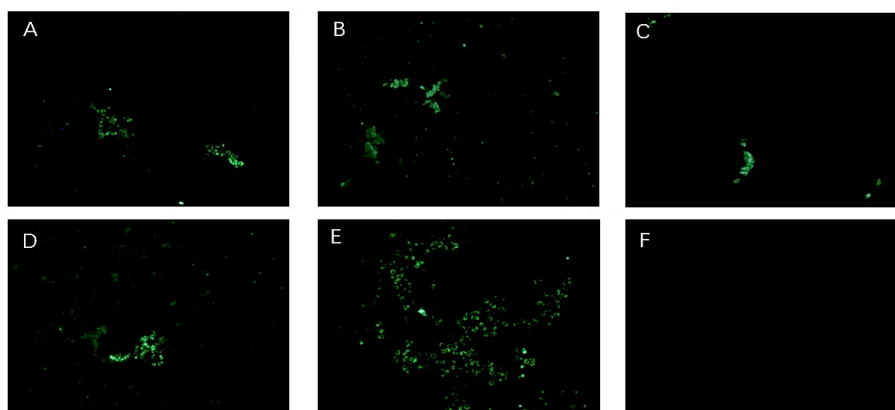


图 19 IFA 复筛阳性杂交瘤结果

A:Mab- E^{ms} -1; B:Mab- E^{ms} -2; C:Mab- E^{ms} -3

D:Mab- E^{ms} -4; E:Mab- E^{ms} -5; F: 阴性对照

Fig.19 IFA re screening positive hybridoma results

A:Mab- E^{ms} -1; B:Mab- E^{ms} -2; C:Mab- E^{ms} -3

D:Mab- E^{ms} -4; E:Mab- E^{ms} -5; F: Negative control

3.3.2 CSFV E^{rms} 蛋白单克隆抗体的鉴定

3.3.2.1 单抗亚型鉴定

采用亚型鉴定试剂盒对单抗亚型进行鉴定，结果（表 9）显示 5 株单抗均为 IgG1。

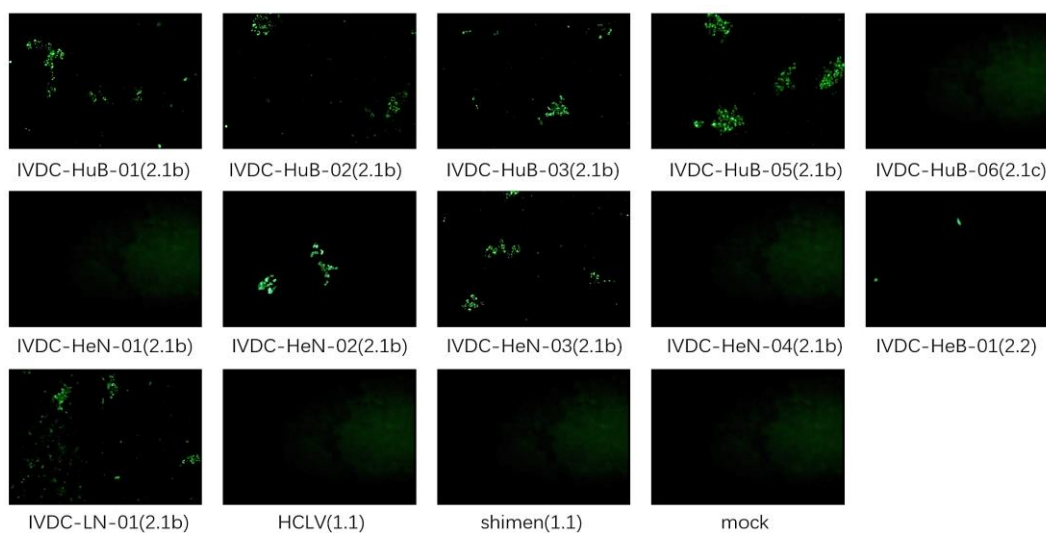
表 9 单克隆抗体亚型鉴定结果

Table 9 Identification results of monoclonal antibody subtypes

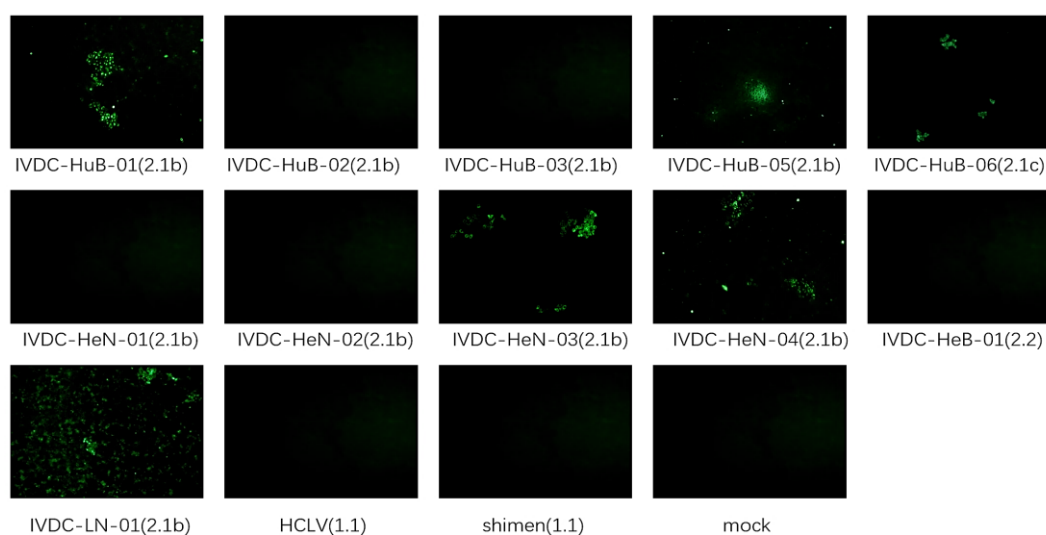
抗体亚型	5 株单克隆抗体亚类鉴定 OD ₄₅₀ 值				
Antibody	OD ₄₅₀ value for subclass identification of 5 monoclonal antibody strains				
subtypes	Mab-E ^{rms} -1	Mab-E ^{rms} -2	Mab-E ^{rms} -3	Mab-E ^{rms} -4	Mab-E ^{rms} -5
G1	<u>1.117</u>	<u>1.129</u>	<u>1.225</u>	<u>1.291</u>	<u>1.147</u>
G2a	0.024	0.029	0.03	0.026	0.025
G2b	0.039	0.043	0.041	0.039	0.041
G3	0.051	0.063	0.041	0.039	0.04
M	0.019	0.028	0.024	0.022	0.022
A	0.044	0.044	0.037	0.036	0.036

3.3.2.2 单抗反应谱的鉴定

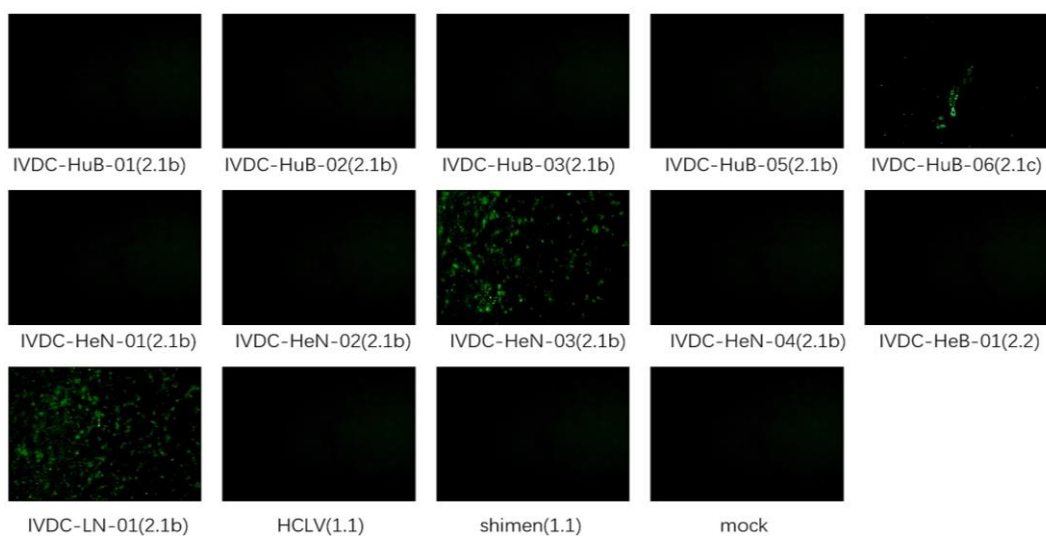
将获得的 5 株 E^{rms} 单克隆抗体与不同基因亚型的猪瘟疫病毒株进行 IFA 鉴定，见图 20，确定 5 株单抗与猪瘟疫病毒的反应性。根据结果可得，IVDC-HeN-03 和 IVDC-LN-01 能全部和这 5 株单抗反应，这两株毒株都为 2.1b 亚亚型，且这 2 株 CSFV E^{rms} 氨基酸与亲本毒株 IVDC-HuB-04 高度同源。Mab-E^{rms}-3 和 Mab-E^{rms}-5 可以和 2.1c 亚亚型的 IVDC-HuB-06 反应，其余三株没有荧光，Mab-E^{rms}-1，Mab-E^{rms}-4 和 Mab-E^{rms}-5 可以和 2.2 亚型的 IVDC-HeB-01 反应，其余两株没有荧光。而与其他 2.1b 亚亚性的毒株只有部分单抗发生了反应，且这五株单克隆抗体都不与 C 株和 SM 株（1.1 亚型）反应，反应谱最广的 Mab-E^{rms}-5 仅能与 64.3%（9/14）的毒株反应。从表 10 可以看出，5 株单抗与不同毒株的反应性存在差异，说明 5 株单抗所识别的表位不同。



A



B



C

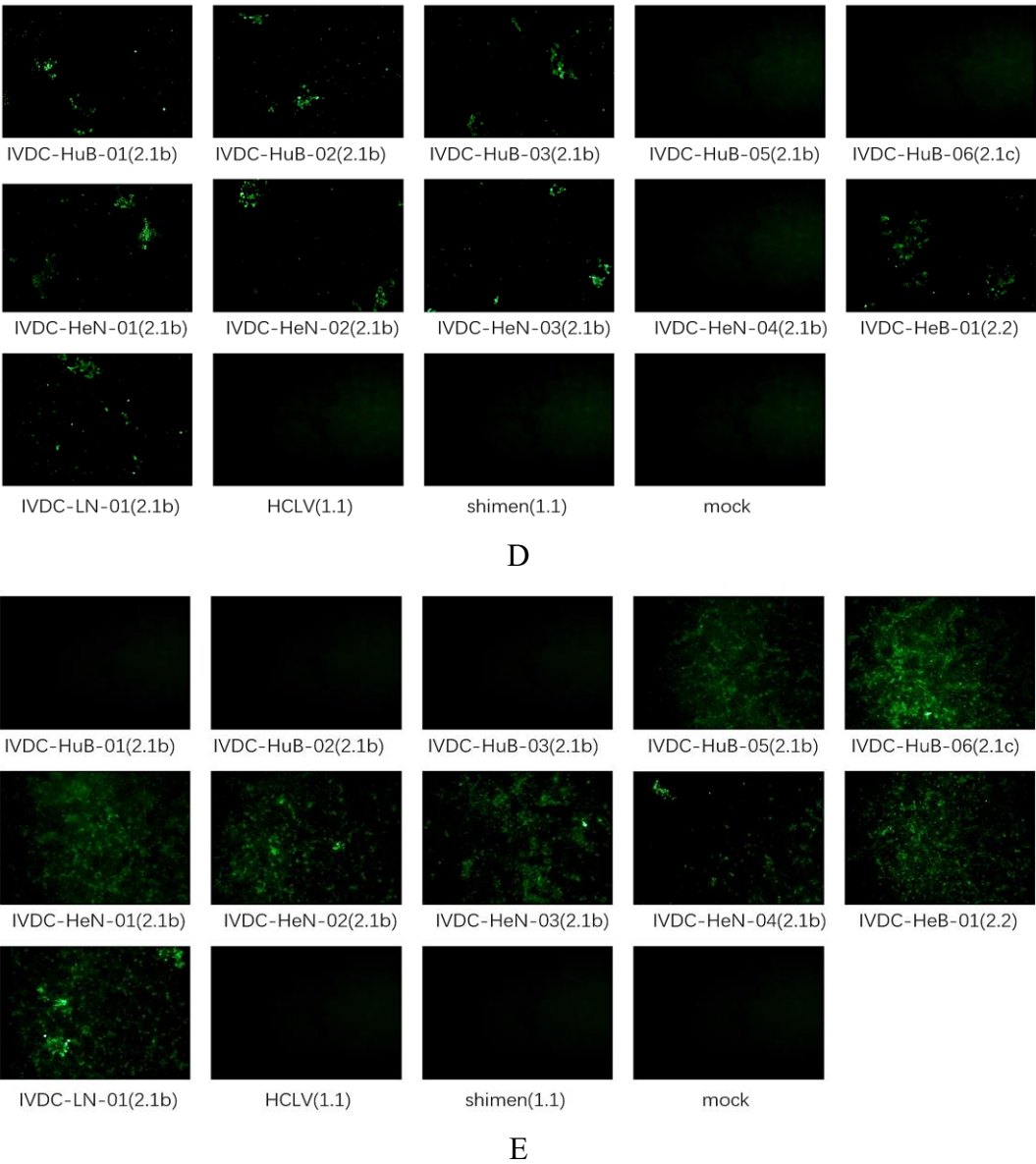


图 20 单抗与不同猪瘟疫毒株的 IFA 反应结果

A: Mab-E^{rns}-1 与感染 CSFV 的 PK-15 细胞反应; B: Mab-E^{rns}-2 与感染 CSFV 的 PK-15 细胞反应;
C: Mab-E^{rns}-3 与感染 CSFV 的 PK-15 细胞反应; D: Mab-E^{rns}-4 与感染 CSFV 的 PK-15 细胞反应;
E: Mab-E^{rns}-5 与感染 CSFV 的 PK-15 细胞反应

Fig.20 IFA reaction results between monoclonal antibodies and different strains of swine fever virus

A: Mab E^{rns}-1 reacts with PK-15 cells infected with CSFV; B: Mab E^{rns}-2 reacts with PK-15 cells infected with CSFV; C: Mab E^{rns}-3 reacts with PK-15 cells infected with CSFV; D: Mab E^{rns}-4 reacts with PK-15 cells infected with CSFV; E: Mab E^{rns}-5 y reacts with PK-15 cells infected with swine fever virus

表 10 单抗反应谱总结

Table 10 Summary of monoclonal antibody response spectrum

	Mab-E ^{rms} -1	Mab-E ^{rms} -2	Mab-E ^{rms} -3	Mab-E ^{rms} -4	Mab-E ^{rms} -5
HuB-01(2.1b)	+	+	-	+	-
HuB-02(2.1b)	+	-	-	+	-
HuB-03(2.1b)	+	-	-	+	-
HuB-04(2.1b)	+	+	+	+	+
HuB-05(2.1b)	+	+	-	-	+
HuB-06(2.1c)	-	+	+	-	+
HeN-01(2.1b)	-	-	-	+	+
HeN-02(2.1b)	+	-	-	+	+
HeN-03(2.1b)	+	+	+	+	+
HeN-04(2.1b)	-	+	-	-	+
HeB-01(2.2)	-	-	-	+	+
LN-01(2.1b)	+	+	+	+	+
C 株(1.1)	-	-	-	-	-
SM 株 (1.1)	-	-	-	-	-

注：“+”表示单抗与毒株有荧光；“-”表示单抗和毒株无荧光。

Note: “+” indicates that the monoclonal antibody and the strain are fluorescent; “-” indicates that the monoclonal antibody and the strain are non-fluorescent.

3.3.2.3 单抗特异性鉴定

采用间接免疫荧光的方法对 5 株单克隆抗体与 PPV、PRV、PCV2 和 PRRSV 进行特异性鉴定，结果如表 11 显示，5 株单克隆抗体均不与其反应。

表 11 单抗特异性验证结果

Table 11 Specific validation results of 5 monoclonal antibodies

	PPV	PRV	PCV2	PRRSV
Mab-E ^{rms} -1	-	-	-	-
Mab-E ^{rms} -2	-	-	-	-
Mab-E ^{rms} -3	-	-	-	-
Mab-E ^{rms} -4	-	-	-	-
Mab-E ^{rms} -5	-	-	-	-
阳性对照	CPE	CPE	+	CPE

注：“+”表示单抗与毒株有荧光；“-”表示单抗和毒株无荧光。

Note: “+” indicates that the monoclonal antibody and the strain are fluorescent; “-” indicates that the monoclonal antibody and the strain are non-fluorescent.

3.3.2.4 单抗与 Western Blot 的反应鉴定

用表达的 E^{rns} 蛋白作为抗原，5 株单克隆抗体作为一抗，免疫小鼠阳性血清作为阳性对照，用 HRP 羊抗鼠抗体作为二抗，进行 Western Blot 验证，结果如图 21，只有 Mab-E^{rns}-2 出现了特异性条带，其余 4 株均无条带。

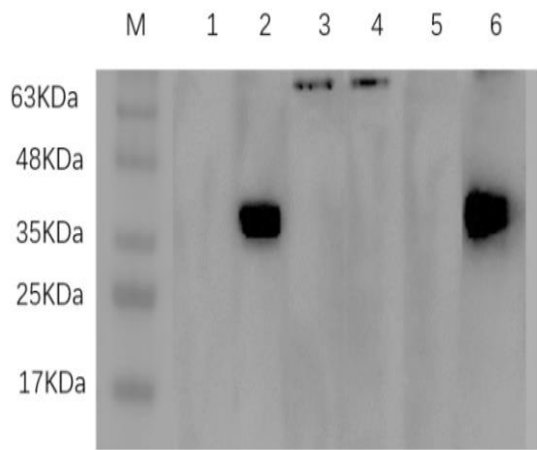


图 21 Western Blot 鉴定结果

M:Marker; 1; Mab-E^{rns}-1; 2: Mab-E^{rns}-2; 3: Mab-E^{rns}-3; 4: Mab-E^{rns}-4; 5: Mab-E^{rns}-5; 6:小鼠多抗

Fig.21 Western Blot identification results

M: Marker; 1; Mab-E^{rns}-1, 2: Mab-E^{rns}-2, 3: Mab-E^{rns}-3, 4: Mab-E^{rns}-4, 5: Mab-E^{rns}-5, 6: Mouse poly antibody

3.3.2.5 单抗中和活性鉴定

将 5 株单克隆抗体与 IVDC-HuB-04 亲本毒株进行中和试验验证。将 CSFV 与 5 株单抗孵育后接种 PK-15 细胞，经过 IFA 鉴定均出现了荧光染色阳性，即中和抗体阴性（表 12），CSFV 均在细胞中进行复制，说明 5 株单抗均没有中和活性。

表 12 单克隆抗体中和活性鉴定

Table 12 Identification of neutralizing activity of monoclonal antibodies

单抗编号	单抗稀释倍数							
Monoclonal antibody number	Dilution factor of monoclonal antibody							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Mab-E ^{rns} -1	-	-	-	-	-	-	-	-
Mab-E ^{rns} -2	-	-	-	-	-	-	-	-
Mab-E ^{rns} -3	-	-	-	-	-	-	-	-
Mab-E ^{rns} -4	-	-	-	-	-	-	-	-
Mab-E ^{rns} -5	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“-”为中和抗体阴性。

Note: "-" is negative for neutralizing antibodies.

3.3.2.6 多抗中和活性的鉴定

为了进一步确定 E^{rns} 抗体对病毒的中和活性，用免疫小鼠的 E^{rns} 阳性血清进行病毒中和试验，结果如下表 13，证明制备的 E^{rns} 多克隆抗体对 CSFV 也无中和活性。

表 13 多抗中和活性鉴定

Table 13 Identification of neutralizing activity of multiple antibodies

	多抗稀释倍数							
	Multiple antibody dilutions							
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
荧光结果	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescence results								
中和活性	-	-	-	-	-	-	-	-
neutralizing activity								

注：“-”为中和抗体阴性。

Note: "-" is negative for neutralizing antibodies.

3.3.2.7 CSFV E^{rns} 单抗阻断效果鉴定

(1) E^{rns} 蛋白最适包被浓度和单抗最适反应浓度的确定：经棋盘滴定，E^{rns} 蛋白最佳包被浓度为 0.3125 μg/mL，单抗最佳稀释倍数为 8,000 倍。

(2) E^{rns} 蛋白与猪瘟阳性血清反应性研究：用最佳 E^{rns} 蛋白浓度包被，封闭后可以发现猪瘟阳性血清可以与 E^{rns} 蛋白反应；

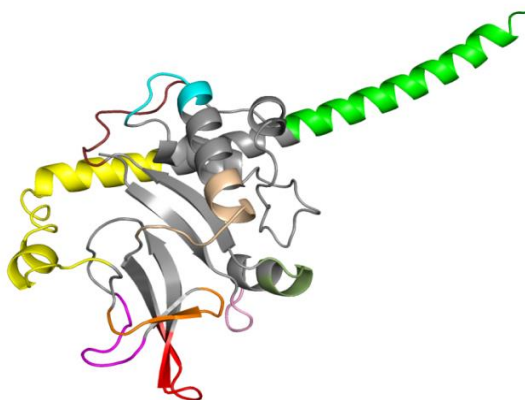
(3) 猪瘟疫阳性血清对单抗的阻断作用研究：用酶标单抗探究猪瘟疫阳性血清对单抗的阻断作用发现，5 株单克隆抗体阻断率均很低，最高的仅为 46.20%，无法进行阻断 ELISA 方法的建立，单抗阻断率见下表 14。

表 14 单抗阻断效果鉴定

Table 14 Identification of the blocking effect of monoclonal antibodies

	Mab-E ^{rns} -1	Mab-E ^{rns} -2	Mab-E ^{rns} -3	Mab-E ^{rns} -4	Mab-E ^{rns} -5
阴性血清 Positive	1.081	1.305	1.274	1.117	1.223
阳性血清 Negative	0.649	1.184	0.845	0.601	0.693
阻断率 blocking	39.96%	9.27%	33.67%	46.20%	43.34%

(4) CSFV E^{rns} 蛋白的结构分析与表位预测：由于免疫的多抗和单抗都没有中和活性，并且抗体的阻断能力都较低，因此对 E^{rns} 的二级结构采用 alphafold 进行分析，预测结构图如图 22，过归一化计算，表位得分阈值为 0.5，结果显示有 10 段多肽超过了阈值，具有表位特征（图 23），并且把 10 个表位在图 22 结构图中进行了标注。由图可知 E^{rns} 蛋白对抗体亲合性存在差异且 E^{rns} 蛋白与抗体结合部位较为分散。

图 22 E^{rns} 蛋白结构图

绿色：Rank-1；红色：Rank-2；黄色：Rank-3；紫红色：Rank-4；橘色：Rank-5；暗红：Rank-6；草绿：Rank-7；粉色：Rank-8；天蓝：Rank-9；沙色：Rank-10

Fig.22 E^{rns} protein structure diagram

Green: Rank-1; Red: Rank-2; Yellow: Rank-3; Purple red: Rank-4; Orange: Rank-5; Dark red: Rank-6; Grass green: Rank-7; Pink: Rank-8; Sky Blue: Rank-9; Sand color: Rank-10

No. ◆	Chain ◆	Start ◆	End ◆	Peptide ◆	Number of residues ◆	Score ◆
1	A	200	227	VTSWLGRQLSTTGKKLERGSKTWFGAYA	28	0.864
2	A	115	123	RYDKNTDVN	9	0.798
3	A	157	186	FNVSVEDILYGDHECGSLFQDTALYLLDGM	30	0.696
4	A	136	143	TGCKKGKN	8	0.659
5	A	147	153	AGTVIEG	7	0.605
6	A	35	44	EKICKGVPTH	10	0.604
7	A	21	25	YLRGV	5	0.602
8	A	10	14	DNGTS	5	0.599
9	A	83	89	NWYNIDP	7	0.588
10	A	99	108	ANLTEGPPDK	10	0.577

图 23 基于 E^{ms} 结构线性表位预测

Fig.23 E^{ms} structure-based linear epitope prediction

3.4 CSFV 间接免疫荧光方法的初步建立

根据单抗反应谱的结果，选择 Mab- E^{ms} -1 和 Mab- E^{ms} -5 等比例混合后的抗体建立 CSFV 间接免疫荧光方法，混合后的抗体能和 12 株分离株全部反应产生荧光，并且不能和疫苗 C 株和 SM 株反应，如图 24 结果所示，可以初步鉴别 CSFV 基因 2 型和基因 1 型。

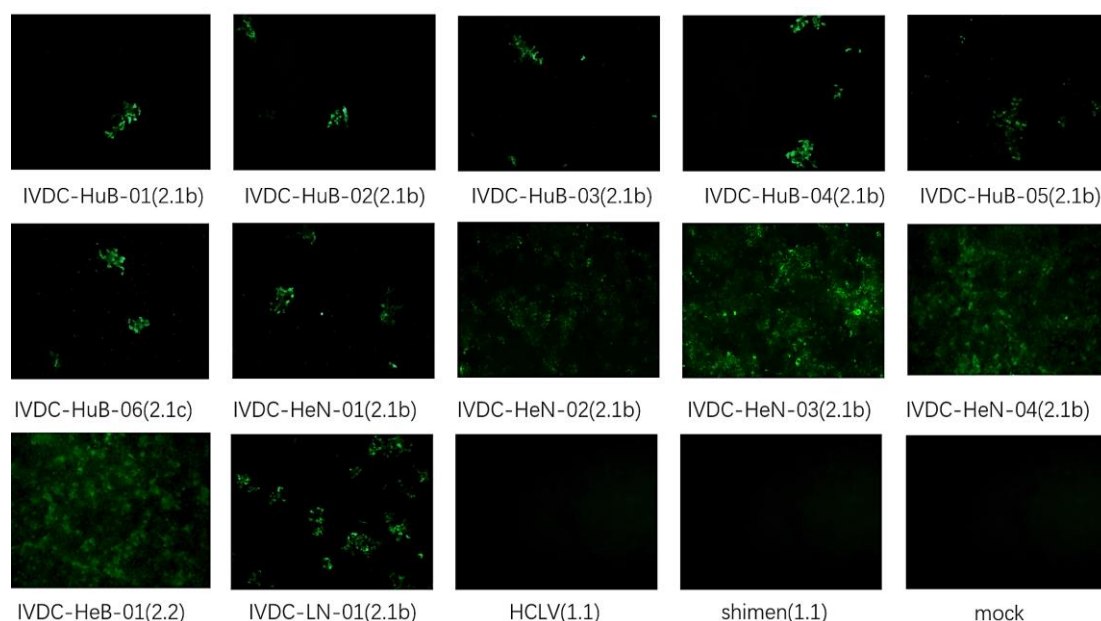


图 24 单抗混合使用间接免疫荧光方法的检测结果

Fig.24 Detection results of mixed use of monoclonal antibodies using indirect immunofluorescence method

3.5 CSFV E^{rns} 抗体间接 ELISA 方法的建立

3.5.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定

采用棋盘法滴定试验确定，以 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 浓度进行 ELISA 抗原包被，血清稀释度在 1:100 时，其 P 值接近于 1，N 值 < 0.1，且 P/N 值最大，因此，将 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 进行包被，1:100 进行血清稀释作为最佳包被浓度和血清稀释度。

3.5.2 包被条件的确定

选择 4°C 包被 12 h、4°C 包被 16 h、4°C 包被 24 h、37°C 包被 1 h 和 37°C 包被 2 h 五个条件进行包被条件的摸索，最终确定包被条件为 4°C 包被 16 h，蛋白的吸附量较高，且 P/N 值最大，如下图 25。因此，4°C 包被 16 h 最佳包被条件。

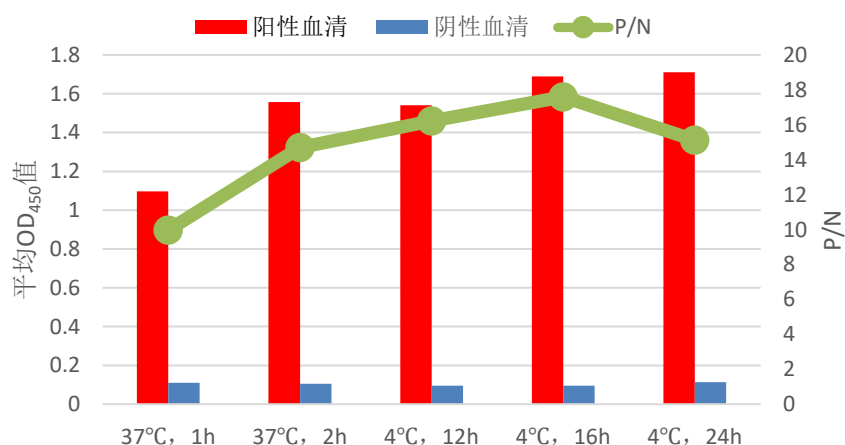


图 25 不同包被条件的效果比较

Fig.25 Comparison of effects under different packaging conditions

3.5.3 最佳封闭液确定

本实验选用 1%BSA、2%BSA、3%脱脂奶粉、5%脱脂奶粉和 10%脱脂奶粉进行封闭，确定封闭效果。结果如下图 26 显示，使用 10%脱脂乳封闭时，P/N 最大，效果最好。

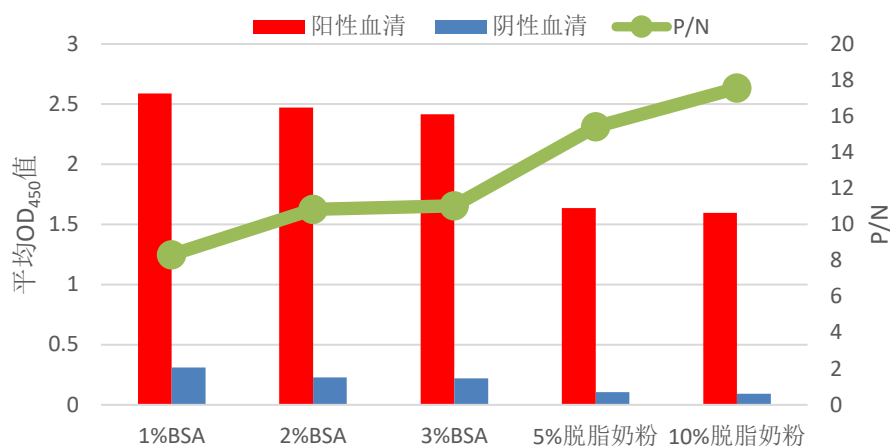


图 26 不同封闭液的效果比对

Fig.26 Comparison of Effects of Different Sealing Liquids

3.5.4 最佳封闭条件的确定

本实验设置了 4 个封闭条件，分别为 37℃封闭 1 h；37℃封闭 2 h；4℃封闭 12 h；4℃封闭 16 h；结果如图 27 显示，4℃封闭 12 h 条件下，P/N 最大，封闭效果最好。

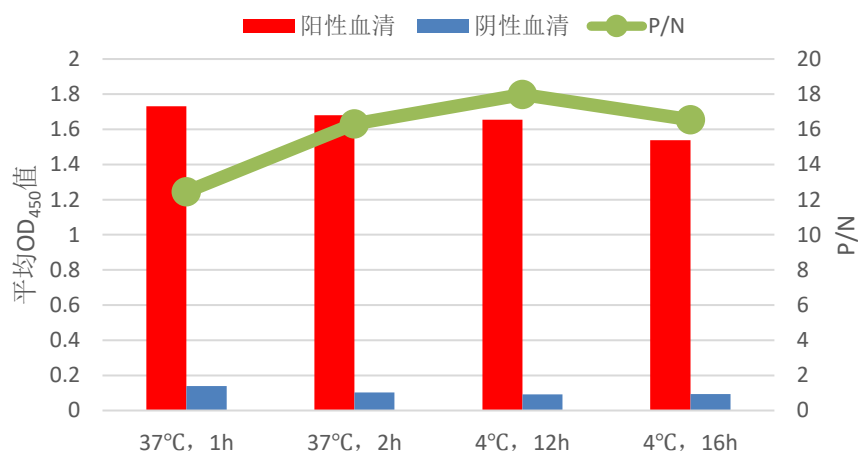


图 27 不同封闭条件的效果比对

Fig.27 Comparison of effects under different closure conditions

3.5.5 最佳酶标抗体工作浓度的确定

酶标抗体稀释度设置 1:5,000、1:10,000、1:15,000 和 1:20,000 四个工作浓度，如下图 28 所示酶标二抗的稀释度为 1:15,000 时，P/N 值最高，因此，1:15,000 作为酶标抗体最佳工作浓度。

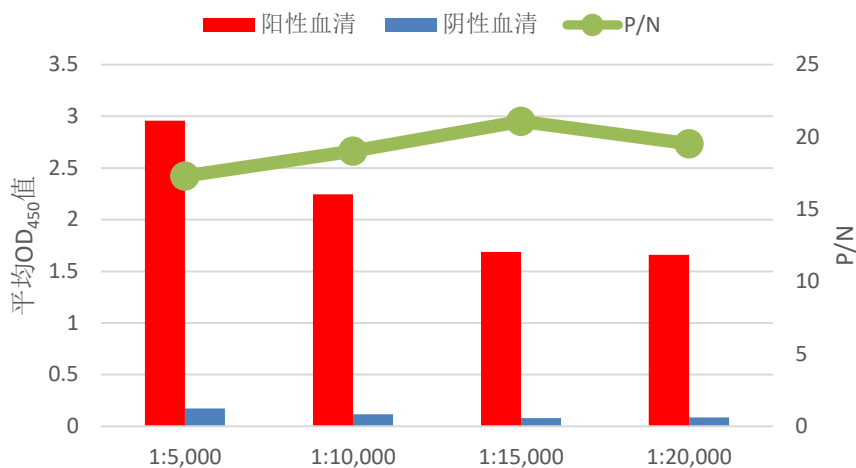


图 28 不同酶标抗体工作浓度的效果比对

Fig.28 Comparison of effects of different enzyme labeled antibody working concentrations

3.5.6 底物反应时间的确定

结果如图 29 所示，底物反应时间 10 min，P/N 值最高，因此，底物反应时间 10 min 为最佳孵育时间。

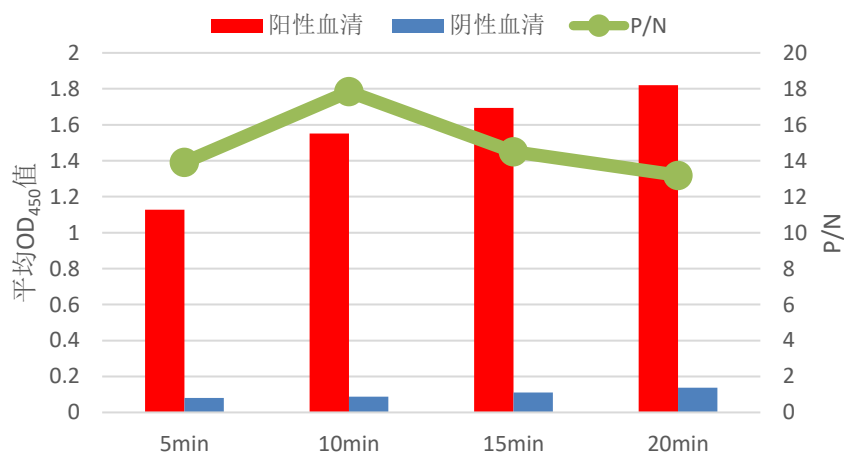


图 29 不同底物反应时间的效果比对

Fig.29 Comparison of Effects of Different Substrate Reaction Times

3.5.7 重复性试验

挑选 4 份猪瘟疫阳性血清和 4 份猪瘟疫阴性血清进行 ELISA 检测后,计算板内变异系数及板间变异系数,结果如下表 15 所示,板内与板间重复的变异系数的范围均在 10%以内,证明该 ELISA 方法具有良好的可重复性。

表 15 重复性试验结果

Table 15 Repetitive test results

编号	板内变异系数			板间变异系数		
number	Coefficient of variation within the board			Coefficient of variation between boards		
	$\bar{x}$	SD	CV%	$\bar{x}$	SD	CV%
P-1	2.263	0.108	4.77	2.349	0.075	3.19
P-2	1.526	0.091	5.96	1.608	0.072	4.48
P-3	0.833	0.021	2.52	0.812	0.018	2.22
P-4	0.378	0.029	7.67	0.363	0.016	4.41
N-1	0.153	0.005	3.27	0.147	0.006	4.08
N-2	0.098	0.005	5.1	0.093	0.007	7.53
N-3	0.083	0.006	7.23	0.087	0.005	5.75
N-4	0.095	0.009	9.47	0.092	0.007	7.61

3.5.8 临界值的确定

使用优化后的 ELISA 方法检测 68 份已知背景的猪血清，包括 30 份阴性血清，38 份阳性血清，读取 OD₄₅₀ 值，将结果用 SPSS 软件绘制 ROC 曲线，如图 30 所示，横坐标为 1-特异性，纵坐标为敏感性，计算 Youden 指数（Youden 指数=敏感性-（1-特异性））算出，选择 Youden 指数最大所对应的值即为临界值，临界值为 0.255。根据重复性试验结果，本方法的变异系数都在 10% 以内所以将临界值±10%临界值作为可疑范围，因此最终的判定标准为：OD₄₅₀ ≥ 0.28 时，判为 E^{ms} 抗体阳性；OD₄₅₀ ≤ 0.23 时，判为 E^{ms} 抗体阴性；0.23 < OD₄₅₀ < 0.28 时，判断为可疑。

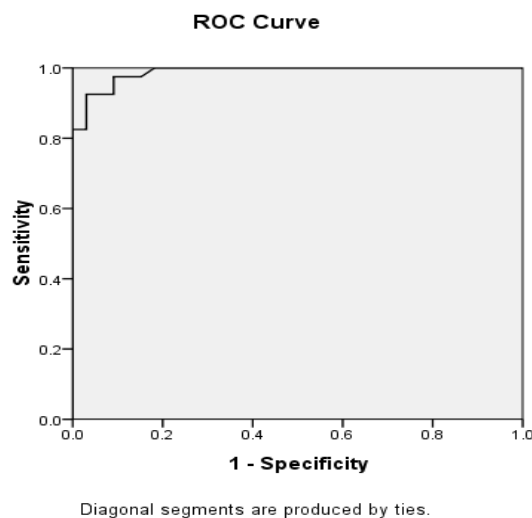


图 30 ROC 曲线

Fig.30 ROC curve

3.5.9 特异性试验

将不同病毒的阳性血清进行稀释，再使用优化后的 E^{ms} 间接 ELISA 抗体检测方法进行检测，结果如图 31 所示，除 CSFV 阳性血清外，其余病原阳性血清使用该方法检验结果均为阴性。

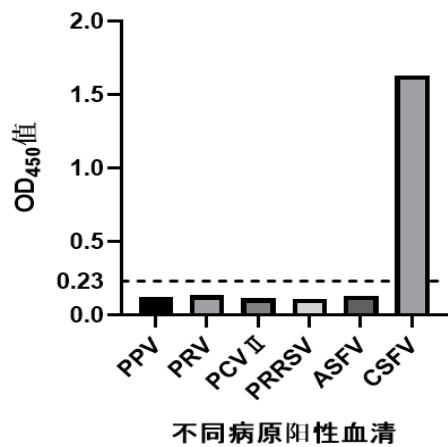


图 31 特异性试验

Fig.31 Specificity test

3.5.10 符合性试验

用以优化后的 ELISA 检测方法检测 E^{ms} 抗体与经中和试验检测后的血清进行检测比较，结果如表 16 所示，计算阳性符合率为 90%，阴性符合率为 70%，总符合率为 78.57%。

表 16 与中和试验符合率

Table 16 Compliance rate with neutralization test

		中和抗体			阳性符合率 positive compliance rate	阴性符合率 Negative compliance rate
		Neutralizing antibody				
		阳性	阴性	合计		
		Positive	Negative	Total		
E ^{rns} 抗体 E ^{rns} antibody	阳性 Positive	27	3	30	90%	
	阴性 Negative	12	28	40		70%
	合计 Total	39	31	70	符合率： 78.57%	
					compliance rate: 78.57%	

3.5.11 CSFV E^{rns} 抗体间接 ELISA 检测方法的应用

(1) 用建立猪瘟病毒 E^{rns} 间接 ELISA 抗体检测方法 with IDEXX 商品化试剂盒（检测 E2 抗体）对 300 份未知背景猪瘟血清进行检测比较，结果如表 17 所示,计算阳性符合率为 99.15%，阴性符合率为 67.7%，总符合率为 84.67%。

表 17 临床样品 E^{rns} 抗体检测结果

Table 17 Clinical sample E^{rns} antibody detection results

		IDEXX			阳性符合率	阴性符合率
		阳性	阴性	合计	positive	Negative
		Positive	Negative	Total	compliance rate	compliance rate
E ^{rns} 抗体 antibody	阳性 Positive	233	2	235	99.15%	
	阴性 Negative	44	21	65		67.7%
	合计				符合率：84.67%	
	Total	277	23	300	compliance rate: 84.67%	

(2) 对两份 E2 亚单位疫苗免疫猪血清，分别命名为（E2-1,E2-2）以及猪瘟弱毒疫苗免疫阳性猪血清，分别命名为（C-1,C-2）使用建立的 ELISA 方法进行检测，结果如下图 32，可以发现，本研究所建立的 E^{rns} 抗体检测方法检测检测 E2 亚单位疫苗免疫阳性血清结果为阴性，检测 C 株疫苗免疫血清为阳性。由于 E2 亚单位疫苗中不含有 E^{rns} 蛋白成分，因此检测结果为阴性与预期相符。C 株疫苗为猪瘟弱毒疫苗，免疫后可以与野毒一样在机体内进行复制，可以产生针对 E^{rns} 蛋白的抗体，因此检验结果为阳性与预期相符。

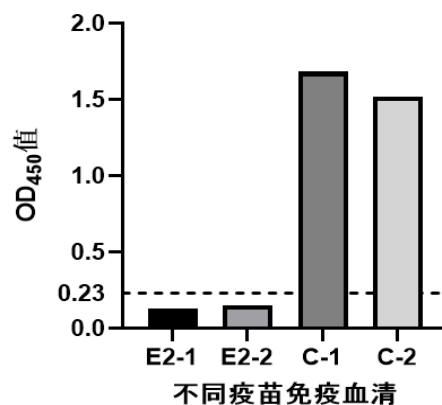


图 32 免疫 E2 亚单位疫苗与免疫弱毒疫苗猪血清鉴别诊断结果

Fig.32 Differential diagnosis results between immune E2 subunit vaccine and immune attenuated piglet serum

4 讨论

4.1 CSFV 流行株 E^{ms} 氨基酸序列分析

本研究从 2022~2023 年的猪瘟疫病料中分离 12 株猪瘟疫流行野毒, 丰富了我国 CSFV 的病毒库, 为进一步研究国内 CSFV 的流行情况和病毒致病性提供了必需生物材料。对分离的毒株遗传演化分析, 其中 11 株都为 2.1 亚型, 只有 1 株为 2.2 亚型, 表明 2.1 亚型依然为我国的流行毒株, 与国内的相关报道结果一致。

为了探究进一步研究 E^{ms} 基因的遗传变异情况, 对 12 株分离毒株的 E^{ms} 基因进行同源性分析, 结果显示 E^{ms} 氨基酸序列比较保守, 结合预测的 E^{ms} 抗原表位分析, 12 株分离株抗原表位中最保守的为 ¹⁴⁷AGTVIEG¹⁵³、²¹YLRGV²⁵、⁸³NWYNIDP⁸⁹ 这三个表位; 与一致性最高的 IVDC-HuB-04 和 IVDC-HeN-03 两个毒株相比, 突变最多的抗原表位为 ²⁰⁰VT SWLGRQLSTTGKKLERGSKTWFGAYA²²⁷, 有 4 株分离株在这个表位突变, 其中有 3 株发生了 “S²⁰⁹R” 的突变, 2 株发生了 “T²¹⁰A” 的突变, Langeduk 等研究发现, 位于 CSFV E^{ms} 蛋白 C 末端 191~227aa 氨基酸处有一抗原表位, 该表位具有鉴别诊断功能, 它不仅能够将 CSFV、BVDV、BDV 区分开来, 而且在未来的新型疫苗(以 E2 为目的蛋白)应用中, 能够将疫苗免疫猪和野毒感染猪鉴别开 (Langedijk *et al.*, 2001)。这个抗原表位与本研究预测的 E^{ms} 蛋白最优势表位的结果相符 (200~227aa), 但该表位在 5 个位点上存在差异, 这些差异位点是否是该表位的关键位点以及该表位的关键氨基酸位点的具体位置, 还有待进一步研究。

4.2 CSFV E^{ms} 蛋白表达分析

由于 E^{ms} 蛋白是囊膜糖蛋白, 会发生糖基化修饰, 所以想要获得天然结构更为相似的 E^{ms} 蛋白, 不能使用原核表达, 因为原核表达菌内不含内质网和高尔基体, 无法对表达的蛋白进行下一步加工修饰, 虽然有研究者证明经原核表达系统所表达的不同 E^{ms} 片段也具有较好的抗原反应性, 但是一般来说病毒结构蛋白的糖基化会影响蛋白的构象和抗体的产生。研究证明, 只有糖基化的 E^{ms} 蛋白才能对致死量 CSFV 的攻击形成保护, 因此, 本研究采用杆状病毒表达的方式表达 E^{ms} 蛋白, 杆状病毒表达系统得到的重组蛋

白抗原性、免疫原性和功能等生物活性与天然蛋白相似。本试验选择 12 株分离株中一致性最高的毒株 IVDC-HuB-04 的 E^{ms} 基因序列进行人工合成并优化密码子后进行表达, 并且在目的基因 N 端插入的信号肽序列, 结果发现表达的 E^{ms} 蛋白并未分泌到培养上清中, 说明蜂毒素肽并不能将 E^{ms} 蛋白从细胞内引导到细胞外, 导致了蛋白的浓度和纯度都收到了很大的影响。E^{ms} 没有疏水的跨膜区 (transmembrane region, TMR), 通过 C 端的两性螺旋结构以一种扁平的方式锚定在病毒囊膜上, 该蛋白有很大一部分为外泌型蛋白。但在本研究中并未获得分泌型表达蛋白, 因此说明在 E^{ms} 蛋白的表达过程中, 应对蛋白基因进行适当的优化和截短, 以期获得最佳的表达效果。

4.3 单克隆抗体表位预测分析

本研究成功筛选出了 5 株 E^{ms} 单克隆抗体, 通过 5 株单抗与 12 株分离株做间接免疫荧光结果来看, 没有一种抗 E^{ms} 单抗能识别所有的毒株。识别谱最宽的一株抗 E^{ms} 单抗也只能识别 64.3% (9/14) 的毒株, 结果表明虽然 E^{ms} 是 CSFV 的一个比较保守的蛋白, 但 E^{ms} 暴露于囊膜外的部分为易变区, 因此 E^{ms} 抗原表位的变异性较大。Mab-E^{ms}-2 单抗识别线性表位, 且通过间接免疫荧光试验证明能够 BVDV 有交叉反应, 说明该单抗识别的位点可能不在 200~227aa 的区段; 另外该单抗不能和 12 株分离株全部反应, 表明该单抗表位并非位于这 12 个毒株的保守区域; 间接免疫荧光试验证明该株单抗能和 7 株分离毒株反应, 5 株不反应。通过对这 12 株 E^{ms} 氨基酸序列进行比较, 结合 E^{ms} 蛋白抗原表位预测分析, 该株单抗识别的位点可能位于⁹⁹ANLTEGPPDKECAVTCRYDKNTD¹²¹ 区域, 但识别的关键位点还需进一步研究。

本研究筛选到其余 4 株单抗均不能与所有毒株反应, 说明该这些表位在不同毒株上的差异较大, 保守性不高。

4.4 E^{ms} 蛋白抗体及其特性分析

在以往对于 E^{ms} 蛋白的认知中, 认为 E^{ms} 是仅次于 E2 的免疫原性糖蛋白, 也能刺激机体产生中和抗体。但在本研究中所筛选的 5 株单抗全部无中和活性, 并且 E^{ms} 免疫小鼠的阳性血清也未检测到中和活性。张改平院士 (Wei *et al.*, 2021) 通过杆状病毒表达 CSFV E^{ms} 蛋白制备亚单位疫苗免疫兔子, 同时做串联表达 E2 和 E^{ms} 蛋白组, E2 蛋

白组以及 C 株疫苗组，三次免疫后攻毒，结果发现，只有免疫 E^{rms} 蛋白组未产生有效保护，米士江博士筛选了 4 株 SM E^{rms} 单抗，经中和试验验证，4 株单抗也均无中和活性，这些结果与本研究结果一致。Weiland 等 (Weiland *et al.*, 1992) 最早报道 E^{rms} 单抗具有中和，该研究是以 CSFV Alfort 株的全病毒粒子作为免疫原，配合以间接免疫荧光和原核表达 E^{rms} 蛋白等方法筛选了 E^{rms} 单抗。E^{rms} 糖蛋白有 9 个潜在的糖基化位点，在病毒粒子中依靠二硫键的连接以同源二聚体的形式存在。上述对中和活性研究的差异是否是由于病毒粒子中 E^{rms} 蛋白的存在形式与表达蛋白不同所导致？是否二聚体形式的 E^{rms} 蛋白对机体刺激的更为充分，导致二聚体的某些特殊结构所产生的抗体可能具有中和活性？这些推测还有待进一步验证。

另外，Weiland 研究使用的毒株为 Alfort，同时张富强等 (张富强等, 2005) 对三株具有中和活性的 CSFV E^{rms} 的单抗进行鉴定和表位，使用的三株 E^{rms} 单抗也均为 Alfort 毒株，属于 1.1 亚型，而张改平院士使用的为中国 C 株，米士江博士使用的是中国石门株，以上三株均为 1.1 亚型，本研究使用的是 2.1b 亚型的 CSFV 毒株，虽然分型相同，但通过氨基酸序列比较发现，在预测表位的 200~227aa 区段，存在一个 Alfort 株与 C 株和 SM 株的差异位点 ²⁰⁹R²¹⁰I，该差异位点是否是产生中和抗体的关键位点还需进一步研究。

4.5 E^{rms} 单抗的阻断效果分析及应用分析

E^{rms} 蛋白是一种分泌型蛋白，参与并介导病毒对细胞的早期感染，所以使用 E^{rms} 抗体检测方法用于分析感染早期采集的血清具有优势。2018 年，我国上市了第一个猪瘟病毒 E2 亚单位疫苗，该疫苗免疫后可以诱导猪群产生针对 E2 蛋白的抗体，而 CSFV 野毒感染耐过猪同样会产生高水平的 E2 抗体。目前市售的猪瘟抗体检测试剂盒均为 E2 抗体检测试剂盒，因此无法对 E2 亚单位疫苗血清和野毒感染血清进行鉴别诊断。而猪瘟野毒感染后，猪体内会产生针对 E2、E^{rms} 两种结构蛋白的抗体，因此可以检测 E^{rms} 抗体用于鉴别猪瘟野毒感染和 E2 亚单位疫苗免疫。在本研究中筛选了 5 株 E^{rms} 单抗，阻断效果均不明显，因此不适用于阻断检测方法的建立。目前没有文献报道有筛选到 CSFV E^{rms} 单抗进行阻断 ELISA 或者竞争 ELISA 方法的建立，推测阻断效果差是目前 E^{rms} 单抗面临的共同性问题。本研究采用 alphafold 数据库预测了 E^{rms} 蛋白结构，从预测

结果可以看出, E^{ms} 的表位平均分散于蛋白的表面, 并未集中在某一区域, 因此推测针对 E^{ms} 产生的抗体均匀分散于蛋白的各个部位, 未出现抗体集中区域, 因此很难产生由于某一表位抗体的丰度较大而导致的阻断效果。

与 E^{ms} 蛋白不同, E2 蛋白抗原结构域集中位于近 N 端的 1/2 部分, 且处于两个相对独立的抗原结构单位内, 分为 4 个抗原结构域 B/C/D/A, 其中 B/C 单元不含保守表位, 决定了不同 CSFV 毒株的抗原特异性; 而 D/A 单元则相对保守, 其中结构域 A 又可分为 3 个亚区: A1、A2 和 A3。A1、B 和 C 结构域能够诱导产生中和抗体。E2 蛋白中包含几个重要的构象表位和线性表位, 但线性表位均不在 B/C 单元内。由此可说明, 针对 E2 蛋白产生的中和性抗体集中于 D/A 亚区, 抗体位置集中。如果筛选的单抗表位位于这一结构域内, 很容易产生阻断效果, 因此针对 E2 蛋白抗体的检测试剂盒多为采用单抗的阻断或竞争 ELISA 试剂盒。

4.6 CSFV E^{ms} 抗体检测分析

本研究采用 E^{ms} 蛋白建立了检测 E^{ms} 抗体的间接 ELISA 方法。经与荧光抗体病毒中和试验和 E2 抗体检测试剂盒进行符合性研究, 证明本方法与中和抗体的总符合率为 78.57%, 与 E2 抗体的总符合率为 84.67%。本实验室前期的研究中, 对 474 份临床血清用中和试验和商品化的 E2 抗体试剂盒进行检测, 结果符合率为 86%。从比较结果可以看出, 无论是 E^{ms} 抗体检测方法还是 E2 抗体检测方法, 与金标准方法(中和试验)都有一定的差异。这种差异并不完全是由于方法优化或工艺造成, 而是由于检测对象差异造成的。首先中和抗体检测的是全部具有中和作用的抗体, 包括 E^{ms} 抗体和 E2 抗体, 但是从抗原性和抗体总量来说, 中和抗体中又以 E2 抗体为主。因此从 E^{ms} 抗体和 E2 抗体与中和试验的符合率来看, E2 抗体的符合率稍高于 E^{ms} 抗体检测方法。但是从临床诊断的角度来说, 二者具有极大的相关性。

本研究采用建立的 E^{ms} 抗体检测方法对猪瘟 E2 亚单位疫苗免疫阳性血清和猪瘟 C 株弱毒疫苗阳性血清进行了检测, 结果证明 E2 亚单位疫苗阳性血清中并不存在 E^{ms} 抗体, 而 C 株疫苗免疫血清中存在 E^{ms} 抗体。由于 C 株疫苗与猪瘟野毒一样均为活病毒, 因此 C 株免疫和野毒感染后都可产生针对 E2 蛋白和 E^{ms} 蛋白的抗体。在进行 E2 亚单位疫苗免疫效果评价时, 不仅需要对 E2 蛋白抗体进行检测, 还需要对 E^{ms} 蛋白抗体进行

检测。本研究所建立的 E^{ms} 抗体检测方法使用场景及判定为：当一个猪场只采用猪瘟 E2 亚单位疫苗时，如果 E2 抗体检测为阳性，同时 E^{ms} 抗体检测为阴性时，说明疫苗免疫合格；如果 E2 抗体检测为阳性，但 E^{ms} 抗体也为阳性时，说明该猪场可能发生了猪瘟野毒感染。

我国经过 70 余年的猪瘟防控，已经完全控制了猪瘟疫情。猪瘟在我国已经由一类动物疫病降为二类动物疫病，且发病率呈现逐年下降的趋势，仅为零星散发。在此大背景下，猪瘟净化已经被正式纳入我国动物疫病防控计划。而猪瘟 E2 亚单位疫苗就是猪瘟净化唯一手段。目前限制亚单位疫苗应用的重要原因之一就是相应的鉴诊断试剂的空白，而 E^{ms} 抗体检测是诊断试剂唯一的瓶颈。因此，本研究所建立的 E^{ms} 抗体检测方法能够帮助亚单位疫苗的应用突破瓶颈，为猪瘟防控提供必要的技术保障。

5 结论

5.1 从 2022~2023 年临床样品中分离出了 12 株 CSFV，其中 2.1 亚型 11 株（占 91.7%），2.1b 亚亚型占 10 株，2.1c 亚亚型占 1 株；2.2 亚型 1 株（占 8.3%）。

5.2 利用 E^{ms} 蛋白制备了 5 株 E^{ms} 单克隆抗体。5 株单抗可与大部分流行毒株反应，但不与疫苗株反应；5 株单抗均无中和活性，且无法被猪瘟阳性血清完全阻断。其中两株单抗混合后初步建立了 CSFV 间接免疫荧光方法，该方法可初步鉴别 CSFV 基因 2 型和基因 1 型。

5.3 建立了 E^{ms} 抗体间接 ELISA 方法，该方法可初步鉴别 E2 亚单位疫苗免疫血清与弱毒疫苗免疫血清。

参考文献

- 包菲. 我国猪瘟病毒流行毒株遗传衍化分析及分离鉴定. 扬州: 扬州大学, 2018.
- 常天明, 孙元, 李宏宇, 贺番, 李淼, 黄俊华, 仇华吉. 猪瘟病毒NS3蛋白的重组表达及其单克隆抗体的制备. 中国兽医科学. 2010. 40 (02):144-149.
- 仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾. 中国农业科学. 2005. (08):1675-1685.
- 高洋根. 猪瘟病毒全基因组测序及表达猪瘟病毒E2和E0蛋白的重组猪痘病毒的构建. 南昌: 江西农业大学, 2016.
- 黄允真. 猪瘟病毒抗原表位/E2蛋白的融合表达及其免疫原性研究. 广州: 华南农业大学, 2019.
- 李菲, 赵立峰, 高云航, 胡桂学. 猪瘟分子生物学诊断新进展. 中国畜牧兽医. 2010. 37 (06):168-170.
- 李娇, 祖立闯, 沈志强, 唐娜, 王金良. 单克隆抗体在猪瘟诊断上的应用. 畜牧与兽医. 2011. 43 (08):88-92.
- 梁冰冰, 孙元, 彭伍平, 夏照和, 仇华吉. 猪瘟病毒中和抗体竞争抑制ELISA检测方法的建立. 中国兽医科学. 2008. (11):957-961.
- 蔺露, 董春霞, 孙燕, 徐璐, 王琴. 采用不同ELISA试剂盒对猪瘟抗体水平调查结果的影响. 中国畜牧兽医文摘. 2015. 31 (01):45-46.
- 米士江. 猪瘟兔化弱毒疫苗株与流行毒株鉴别单抗的筛选及其特性研究. 长春: 军事科学院, 2018.
- 米士江. 猪瘟病毒流行毒株与疫苗株鉴别单抗和广谱性单抗的鉴定及其抗原表位解析. 长春: 吉林大学, 2022.
- 庞会宁. 非编码区和非结构蛋白NS5B调节猪瘟疫苗C株复制机制研究. 武汉: 武汉大学, 2021.

- 彭志成, 龚文杰, 吕宗吉, 胡敬东, 郭焕成, 涂长春. 广东省猪瘟病毒流行毒株遗传多样性分析. 中国兽医学报. 2014. 34 (06):894-903.
- 申秋平, 王丽群, 曹霞, 庄林林. 猪瘟病毒快速检测方法研究进展. 现代畜牧兽医. 2023. (07):72-77.
- 宋香朋, 夏应菊, 徐璐, 赵俊杰, 王震, 王琴, 张乾义. 猪瘟病毒结构蛋白和非结构蛋白功能最新研究进展. 中国兽医科学. 2022. 52 (04):499-506.
- 孙永芳, 徐璐, 张乾义, 王琴. 猪瘟病毒抗原表位的研究进展. 中国兽医杂志. 2017. 53 (07):72-75.
- 王琴, 涂长春. 猪瘟. 北京: 中国农业出版社, 2015:2-3.
- 王琴, 王在时, 赵耘, 范学政, 徐璐, 宋立, 朗洪武, 丘惠深, 宁宜宝, 杨汉春. 我国猪瘟病毒流行株抗原性分析. 第六届理事会第二次会议暨教学专业委员会2006年会议论文集. 大庆: 出版社不详, 2006:200-204
- 徐璐, 范学政, 徐和敏, 赵启祖, 邹兴启, 朱元源, 王琴, 宁宜宝, 王芳. 猪瘟抗体间接ELISA检测方法的建立和优化. 中国兽医杂志. 2012. 48 (03):15-17+97.
- 许保疆. 稳定分泌抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及初步应用. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- 叶文华. 猪瘟病毒致病机制及猪瘟诊断防控. 吉林畜牧兽医. 2024. 45 (01):40-42.
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997:645-667.
- 张富强, 李志华, 张念祖. 猪瘟病毒糖蛋白E^{ms}中和表位的鉴定和比较. 微生物学报. 2005. (01):66-71.
- 张璞, 陈建凯, 赖月辉, 林德锐, 李复坤, 周晓敏, 侯高伟, 齐冬梅. 猪瘟病毒检测和猪瘟疫苗研究进展. 广东农业科学. 2022. 49 (04):106-115.
- 周泰冲. 猪瘟病毒与防制猪瘟的研究进展(续). 兽医科技杂志. 1980. (05).
- Beer M., Reimann I., Hoffmann B. and Depner K.. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine*. 2007 25 (30):5665-70.

- Brown L M., Papa R A., Frost M J., Mackintosh S G., Gu X., Dixon R J. and Shannon A D.. A single amino acid is critical for the expression of B-cell epitopes on the helicase domain of the pestivirus NS3 protein. *Virus Res.* 2002 84 (1-2):111-24.
- Deng M C., Huang C C., Huang T S., Chang C Y., Lin Y J., Chien M. S. and Jong M. H.. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan. *Vet Microbiol.* 2005 106 (3-4):187-93.
- Dewulf J., Laevens H., Koenen F., Mintiens K. and De Kruif A.. An experimental infection with classical swine fever virus in pregnant sows: transmission of the virus, course of the disease, antibody response and effect on gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2001 48 (8):583-91.
- Edwards S. and Sands J J.. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1990 97 (2):79-81.
- Freitas T R., Gaspar L P., Caldas L A., Silva J L. and Rebello M A.. Inactivation of classical swine fever virus: association of hydrostatic pressure and ultraviolet irradiation. *J Virol Methods.* 2003 108 (2):205-11.
- Huang Y L., Meyer D., Postel A., Tsai K J., Liu H M., Yang C H., Huang Y C., Chang H W., Deng M C., Wang F I., Becher P., Crooke H. and Chang C Y.. Identification of neutralizing epitopes on the D/A domain of the E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *Virus Res.* 2023 336:199209.
- Langedijk J P., Middel W G., Melen R H., Kramps J A. and de Smit J A.. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *J Clin Microbiol.* 2001 39 (3):906-12.
- Lin M., Trottier E., Pasick J. and Sabara M.. Identification of antigenic regions of the Erns protein for pig antibodies elicited during classical swine fever virus infection. *J Biochem.* 2004 136 (6):795-804.

- Lin M., Lin F., Mallory M. and Clavijo A.. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol.* 2000 74 (24):11619-25.
- Moennig V., Becher P. and Beer M.. Classical swine fever. *Dev Biol (Basel).* 2013 135:167-74.
- Pereda A J., Greiser-Wilke I., Schmitt B., Rincon M A., Mogollon J D., Sabogal Z Y., Lora A M., Sanguinetti H. and Piccone M. E.. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America. *Virus Res.* 2005 110 (1-2):111-8.
- Schulz K., Staubach C. and Blome S.. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet Res.* 2017 48 (1):84.
- SHOPE R. E.. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for hog cholera virus. I. The provocation of masked hog cholera virus in lungworm-infested swine by ascaris larvae. *J Exp Med.* 1958 107 (5):609-22.
- van Rijn P A., van Gennip H G., de Meijer E J. and Moormann R. J.. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. *J Gen Virol.* 1993 74 (Pt 10):2053-60.
- Voller A. and Bidwell D E.. A simple method for detecting antibodies to rubella. *Br J Exp Pathol.* 1975 56 (4):338-9.
- Wei Q., Bai Y., Song Y., Liu Y., Yu W., Sun Y., Wang L., Deng R., Xing G. and Zhang G.. Generation and immunogenicity analysis of recombinant classical swine fever virus glycoprotein E2 and E(rns) expressed in baculovirus expression system. *Virol J.* 2021 18 (1):44.
- Weiland E., Ahl R., Stark R., Weiland F. and Thiel H J.. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol.* 1992 66 (6):3677-82.
- Wensvoort G., Terpstra C., de Kluijver E P., Kragten C. and Warnaar J C.. Antigenic

differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet Microbiol.* 1989 21 (1):9-20.

Yang Z.. Maximum likelihood estimation on large phylogenies and analysis of adaptive evolution in human influenza virus A. *J Mol Evol.* 2000 51 (5):423-32.

Zhang H., Wen W., Zhao Z., Wang J., Chen H., Qian P. and Li X.. Enhanced protective immunity to CSFV E2 subunit vaccine by using IFN-gamma as immunoadjuvant in weaning piglets. *Vaccine.* 2018 36 (48):7353-7360.