



河北农业大学

HEBEI AGRICULTURAL UNIVERSITY

全日制硕士专业学位（毕业）论文

猪瘟病毒 E0、E2 基因的原核表达
及间接 ELISA 方法建立

学位申请人：高佩佩

指导教师：范京惠 副教授

学位名称：兽医硕士

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一九年六月四日

分类号: S855.3
密 级: 公开

单位代码: 10086
学 号: 20177200825

猪瘟病毒 E0、E2 基因的原核表达 及间接 ELISA 方法建立

Prokaryotic Expression of E0 and E2 genes of Classical Swine Fever Virus and Establishment of Indirect ELISA for Detection Antibody

学位申请人: 高佩佩
指导教师: 范京惠 副教授
学位名称: 兽医硕士
授予单位: 河北农业大学
答辩日期: 二〇一九年六月四日

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得河北农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：高佩佩 签字日期：2019年6月10日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解河北农业大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权河北农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：高佩佩

导师签名：范京惠

签字日期：2019年6月10日

签字日期：2019年6月10日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

摘要

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病。CSFV自19世纪在美国被首次报道以来,对世界养猪业的健康发展造成了严重的影响。猪瘟作为世界卫生组织(OIE)规定的A类疫病,世界上仍主要通过免疫弱毒疫苗的方法来对其进行防控。传统猪瘟弱毒疫苗免疫效力好,给猪群提供了较好的保护。但使用这种类型的疫苗后无法区分感染抗体和疫苗抗体。E2亚单位疫苗是最早投入使用也是当前惟一投入使用的猪瘟标记疫苗。免疫E2亚单位疫苗后不仅能够对抗CSFV野毒株,而且很容易通过检测抗E0蛋白的抗体区分免疫猪和感染猪。在CSFV编码的结构蛋白中,E0和E2糖蛋白均可诱导机体产生中和抗体,同时也是建立CSFV血清学检测方法的主要抗原。因此,在免疫E2亚单位疫苗的基础上,可以利用CSFV的E0和E2基因构建的检测方法,用来分析疫苗免疫效果以及初步区分疫苗抗体和感染抗体,这为进一步开发猪瘟检测试剂盒提供了参考。本实验进行了一系列的研究:

(1)根据GeneBank中登录的猪瘟病毒E0和E2基因序列,并参考pET32a载体和蛋白的特点进行特异性引物的设计与合成,并且在引物的上下游5'端分别插入EcoRI和XhoI两种限制性内切酶的酶切位点。E0和E2基因经RT-PCR扩增,得到基因片段分别为699bp和558bp的条带,经克隆测序鉴定后的质粒命名为pMD19T-E0,pMD19T-E2。将pET32a线性载体与克隆质粒中切下的E0和E2基因连接构建重组表达质粒pET32a-E0,pET32a-E2,随后将重组质粒转入宿主菌BL21(DE3)中并进行诱导表达,经SDS-PAGE检测有与预期大小相合的蛋白大量表达,且蛋白主要存在于包涵体中。利用镍柱亲和层析法对pET32a-E0、pET32a-E2蛋白进行纯化,Western-blotting显示pET32a-E0、pET32a-E2蛋白的反应原性较好。

(2)利用纯化的pET32a-E0重组蛋白作为抗原,构建了间接ELISA方法。对反应条件的优化结果显示:pET32a-E0重组蛋白的最适抗原包被浓度为0.6 μ g/mL,包被时间为37 $^{\circ}$ C 2 h,4 $^{\circ}$ C过夜;最佳封闭条件为PBST缓冲液稀释的胎牛血清(5%)于37 $^{\circ}$ C恒温反应1 h;血清和酶标抗体的最适稀释度分别为1:100和1:20000,两者均于37 $^{\circ}$ C反应1 h;TMB底物显色液于室温暗处反应10 min。基于pET32a-E0蛋白建立的方法重复性试验(批内和批间)显示变异系数小于10%,且与PRRSV、PCV、PRV、PEDV、TGEV阳性血清间不存在抗原交叉反应,具有较高的重复性与特异性。

(3)利用纯化的pET32a-E2重组蛋白作为包被抗原进行了间接ELISA方法的建立,对反应条件的优化和选择结果显示pET32a-E2重组蛋白的适宜反应浓度为1.6 μ g/mL于37 $^{\circ}$ C恒温反应2 h后置于4 $^{\circ}$ C过夜;采用PBST缓冲液溶解的脱脂奶粉(5%)进行封闭效果最好,37 $^{\circ}$ C恒温反应1 h;血清和酶标二抗的最适稀释倍数分别为1:80和1:20000,两者均于37 $^{\circ}$ C恒温反应1 h;TMB底物显色液于暗处室温反应15 min最佳。所建立的方法重复性试验(批内和批间)显示变异系数小于10%,且与PRRSV、PCV、PRV、PEDV、TGEV阳性血清间不存在抗原交叉反应,具有较高的重复性与特异性。该方法为CSFV抗体的检测提供了一种相对实用的ELISA诊断方法。

关键词：猪瘟病毒； E0 蛋白； E2 蛋白； ELISA； 诊断方法

Prokaryotic Expression of E0 and E2 genes of Classical Swine Fever Virus and Establishment of Indirect ELISA for Detection Antibody

Author: Gao Peipei

Advisor: Fan Jinghui Associate Professor

Major: Veterinary Medicine

Abstract

Classical swine fever (CSF) is an acute, intense, highly contagious disease caused by classical swine fever virus (CSFV). Since its first report in the United States in the 19th century, CSFV has caused a serious impact on the healthy development of the world pig industry. As a Class A disease prescribed by the World Health Organization (OIE), CSFV are mainly controlled by injection of attenuated vaccines. The traditional swine fever attenuated vaccine has good immune efficacy and provides better protection for the pig herd. However, it is impossible to distinguish between infected antibodies and vaccine antibodies after using this type of vaccine. The E2 subunit vaccine is the earliest CSF marker vaccine. Immunization of the E2 subunit vaccine not only protects against CSFV wild-type strains, but also easily distinguishes between immunized pigs and infected pigs by detecting antibodies against E0 protein. Among the structural proteins encoded by CSFV, both E0 and E2 glycoproteins can induce the production of neutralizing antibodies, and are also the main antigens for establishing CSFV serological assays. Therefore, on the basis of immune E2 subunit vaccine, the detection method constructed by the E0 and E2 genes of CSFV can be used to analyze the immune effect of vaccine and preliminarily distinguish vaccine antibody from infection antibody, which provides a reference for the further development of CSFV detection kit. This experiment conducted a series of studies:

(1) Specific primers were designed and synthesized according to the E0 and E2 genes sequences of CSFV registered in GeneBank, and referring to the characteristics of pET32a vector and protein of E0 and E2, and the 5' end of the primers of the upstream and downstream were inserted into *EcoRI* and *XhoI* respectively. The E0 and E2 genes were amplified by RT-PCR, and the gene fragments were 699 bp and 558 bp, respectively. The plasmids identified by cloning and sequencing were named pMD19T-E0, pMD19T-E2. The pET32a linearized vector was ligated with the E0 and E2 genes excised from the cloning plasmid to construct the recombinant expression plasmid pET32a-E0 and pET32a-E2, and then the recombinant plasmid was transferred into the competent cell BL21 (DE3) and induced to express and detected by SDS-PAGE. A large amount of protein expressed in the expected size is detected, and the protein is mainly present in the inclusion body. The pET32a-E0 and pET32a-E2 proteins were purified by nickel column affinity

chromatography. Western-blotting showed that the pET32a-E0 and pET32a-E2 proteins had good reactivity.

(2) An indirect ELISA method was constructed using the purified pET32a-E0 recombinant protein as an antigen. The optimized reaction conditions showed that the optimal antigen coating concentration of pET32a-E0 recombinant protein was 0.6 μg /mL, and coating at 37°C for 2 h and incubated at 4°C overnight; the best blocking condition was that fetal bovine serum (5%) diluted with PBST buffer was incubated at 37°C for 1 h; the optimal dilutions of serum and enzyme-labeled antibodies were 1:100 and 1:20000, respectively, both of them were reacted at 37°C for 1 h; TMB substrate was reacted in the dark room for 10 min. The method based on pET32a-E0 protein established repeatability test (both intra-batch and inter-batch) showed a coefficient of variation of less than 10%, and there was no antigen cross-reactivity with PRRSV, PCV, PRV, PEDV, TGEV positive serum, with high repetition and specificity.

(3) The indirect ELISA method was established using the purified pET32a-E2 recombinant protein as the coating antigen. The optimization of the reaction conditions and the selection results showed that the suitable concentration of pET32a-E2 recombinant protein was 1.6 μg / mL and the temperature was constant at 37°C for 2 h. After being placed at 4°C overnight, the best blocking condition was incubation with the skim milk powder (5 %) dissolved in PBST buffer, and the reaction was constant at 37°C for 1 h; the optimal dilution ratios of serum and enzyme secondary antibody were 1:80 and 1: 20000, both were reacted at 37°C for 1 h; TMB substrate color solution was best reacted in the dark at room temperature for 15 min. The established method's repeatability test (intra-batch and inter-batch) showed that the coefficient of variation was less than 10%, and there was no antigenic cross-reaction with PRRSV, PCV, PRV, PEDV and TGEV positive serum, showing high repeatability and specificity. It provides a relatively practical ELISA diagnostic method for the detection of CSFV antibodies.

Key words: classical swine fever virus; E0 protein; E2 protein; ELISA; diagnostic method

缩略词表

ABBREVIATIONS

英文缩写	英文全称	中文全称
AMP	Ampicillin	氨苄青霉素
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CSF (V)	Classical Swine Fever (virus)	猪瘟 (病毒)
DAB	3, 3'-diamino benzidine	3, 3'-二氨基联苯胺
EB	Escherichia	溴化乙锭
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	大肠杆菌
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FMDV	foot-and-mouth disease virus	口蹄疫病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	isopropyl- β -d-thiogalactoside	异丙基- β -d-硫代半乳糖苷
KDa	Kilodalton	千道尔顿
Kb	Kilo base pair	千碱基对
mg	Milligram	毫克
NC 膜	Nitrocellulose membrane	硝酸纤维膜
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
PRV	Pseudorabies virus	伪狂犬病毒
PCV2	Porcine circovirus type 2	猪圆环病毒 2 型
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
TGEV	Transmissible gastroenteritis virus	猪传染性胃肠炎病毒
μ L	Microliter	微升

目 录

1 引言.....	1
1.1 CSFV 概述.....	1
1.1.1 CSF 的流行病学.....	1
1.1.2 CSF 的临床症状及病理变化.....	1
1.1.3 CSFV 的形态结构及基因组结构.....	2
1.1.4 CSFV 的培养特性.....	2
1.1.5 CSFV 编码的主要蛋白.....	2
1.2 CSF 常用实验室诊断方法.....	4
1.2.1 RT-PCR 检测.....	4
1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测.....	5
1.2.3 免疫胶体金检测.....	5
1.2.4 ELISA 方法检测.....	5
1.2.5 LAMP 检测.....	6
1.3 CSFV 疫苗研究进展.....	6
1.3.1 弱毒疫苗.....	6
1.3.2 亚单位疫苗.....	7
1.3.3 核酸疫苗.....	7
1.3.4 合成肽疫苗.....	8
1.3.5 活载体疫苗.....	8
1.4 研究目的与意义.....	9
2 材料与方法.....	10
2.1 材料.....	10
2.1.1 病料与血清.....	10
2.1.2 主要仪器.....	10
2.1.3 试验所用溶液.....	10
2.1.4 其他相关试验材料.....	11
2.2 方法.....	11
2.2.1 CSFV E0、E2 基因的克隆扩增及重组表达质粒的构建.....	11
2.2.2 重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的表达、鉴定与纯化.....	14
2.2.3 pET32a-E0、pET32a-E2 重组蛋白间接 ELISA 检测方法的建立.....	15
3 结果.....	18
3.1 CSFV E0、E2 基因的扩增及鉴定.....	18
3.2 CSFV E0、E2 基因的原核表达.....	18
3.2.1 重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的鉴定及表达.....	18
3.2.2 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白的可溶性鉴定.....	20

3.2.3 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白的纯化及反应原性鉴定	21
3.3 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 方法建立	23
3.3.1 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白及阴阳性血清最佳稀释浓度	23
3.3.2 最适封闭液确定	24
3.3.3 最佳包被时间确定	25
3.3.4 最佳酶标二抗稀释倍数	25
3.3.5 底物最佳显色时间	26
3.3.6 阴阳性临界值的确定	27
3.3.7 特异性试验	28
3.3.8 重复性试验	28
3.3.9 临床样品的检测	30
4 讨论	32
4.1 CSFV E2 和 E0 基因的克隆及原核表达	32
4.2 重组 pET32a-E0 和 pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立	32
5 结论	34
参考文献	35
附录	43
作者简介	48
致谢	49

1 引言

1.1 CSFV 概述

猪瘟疫是由猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种具有重要经济意义的烈性传染病,对养猪业危害极大。猪瘟疫被世界动物卫生组织(OIE)列为主要传染病之一。猪瘟疫在我国各个地区都有存在,温和型猪瘟疫已成为当前的主要流行形式,一旦感染,在场内形成恶性循环,会给养殖业造成巨大的经济损失^[1]。

1.1.1 CSF 的流行病学

猪是猪瘟疫病毒的唯一自然宿主,在自然条件下,所有的分泌物和排泄物,特别是唾液、尿液、精液和粪便等,都是病毒的丰富来源,并且猪可以通过摄入受污染的产品或通过受污染的运输工具及蚊蝇等传播媒介而受到感染;空气传播也是猪瘟疫病毒传播的重要途径,有报道说人群也是猪瘟疫病毒的传播者^[2]。感染强毒株的猪只可能会在出现临床症状之前通过口,鼻,眼泪,尿,粪等途径向外排毒,从而导致猪群的高发病率和死亡率,种公猪还可通过精液排毒^[3,4]。CSFV 可以在山羊,绵羊,牛和兔子等体内贮存,但并不出现临床症状。该病毒可以长期存活,因为它对许多化学和物理条件具有很强的抵抗力^[5]。目前,胎盘垂直传播和持续性感染猪与易感猪的直接接触是主要传播方式。

本病一年四季均可发生,但在春秋易出现季节性升高。自 1954 年,我国成功研制出猪瘟疫兔化弱毒疫苗随后辅以免疫预防为主的猪瘟疫防疫计划,这些措施在一定程度上控制了猪瘟疫的流行,使猪瘟疫的大规模爆发基本停止^[6]。由此,猪瘟疫的流行出现了新的特点,包括周期性,波浪性、地区散发性等,发病特点表现为非典型性、温和型及隐形感染,并且持续性感染和先天性感染的问题逐渐突出,免疫失败的现象普遍存在^[7]。这些问题的出现导致猪瘟疫在强制免疫的情况下仍然没有得到有效控制,与多种疾病的混合感染以及继发感染也给该病的诊断带来了极大困难。对于生猪养殖量极大的我国,猪瘟疫依然造成严重的经济损失。

1.1.2 CSF 的临床症状及病理变化

根据猪瘟疫临床症状和该病的病理特征,猪瘟疫可分为 3 种类型,分别为急性型、慢性型和迟发型^[3,8]。

急性型常发生于 12 周龄以下的仔猪,表现为发热(40°C 以上),稽留不退,眼结膜发炎,流泪并伴有脓性分泌物;先便秘后腹泻,粪便中带有黏液或血液。病初皮肤先充血发红,继而变成紫绀色,后期可在耳,颈部,外阴,四肢等处皮肤出现出血点或出血斑。后期经常出现神经系统症状,例如后腿无力,运动不协调和抽搐。由于内皮细胞变性和坏死,血小板减少和纤维蛋白原合成受损,病理学常表现为不同器官如

肺，肾，肠和膀胱的浆膜和粘膜表面淋巴结肿大，出血和瘀斑，特别是腹股沟、肠系膜淋巴结肿大出血，呈大理石或黑红色外观；肾脏表面有针尖状出血点，脾脏边缘出现紫黑色出血性梗死灶，通常还会存在非化脓性脑炎^[9]。

慢性型临床症状不典型，一般初期出现精神沉郁，食欲减退，便秘与腹泻交替出现等与急性型相似的症状，恢复正常后出现生长不良。特征性病理变化是在回肠末端、盲肠或结肠发生纽扣状溃疡、坏死。由于钙磷代谢障碍，从肋骨、肋软骨联合到肋骨近端常见一条紧密、突起的骨化线^[10]。

迟发型是先天性感染猪瘟病毒的结果，可引起怀孕母猪的流产，死胎，木乃伊胎，产出弱小或先天性震颤的仔猪，一般以死亡为结局^[11,12]。死胎和弱胎常出现脱毛积水与皮下水肿。胎儿畸形包括头、四肢变形，肌肉发育不良、内脏器官畸形。仔猪出生后不久便死亡的病例常常可见外周淋巴器官中生发滤泡和淋巴细胞严重缺乏，且胸腺萎缩，皮肤与内脏器官有弥漫性出血点^[13]。

1.1.3 CSFV 的形态结构及基因组结构

猪瘟病毒与羊边界病毒和牛病毒性腹泻病毒同属于黄病毒科瘟病毒属成员，它们能够产生交叉免疫学反应与交叉保护作用。猪瘟病毒粒子呈球形，具有二十面体的非螺旋形核衣壳。该病毒具有囊膜，表面具有穗样的糖蛋白纤突。CSFV 具有约 12.3kb 的单链正义 RNA 基因组，其中一个大的开放阅读框两侧是 5'和 3'非翻译区^[14]。它编码大约 4000 个氨基酸，病毒基因表达通过将该开放阅读框翻译成大的多蛋白而发生，所述多蛋白通过病毒以及宿主细胞编码的蛋白酶以共翻译和后翻译的形式加工产生至少 12 种切割产物^[15-17]，包括 8 种非结构蛋白（Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B）和四种结构蛋白（C, Erns, E1 和 E2）^[18]。其中 E0 和 E2 两种糖蛋白在天然宿主中诱导保护性免疫，参与病毒的感染过程以及诱导机体产生中和抗体^[19,20]。

1.1.4 CSFV 的培养特性

从组织或血液中分离到的病毒可以在猪肾细胞系或猪睾丸细胞等多种哺乳动物细胞上进行培养。CSFV 不会致细胞发生病变，因此在孵育 1-3 天后需要荧光抗体测试或免疫过氧化物酶染色来检测 CSFV 抗原^[21]。病毒成分在胞浆内合成和装配后释放到细胞外，细胞培养物中病毒的传播方式主要有三种，分别是被感染细胞释放病毒通过培养液感染新的易感细胞、被感染细胞通过有丝分裂将病毒传染给子代细胞以及通过细胞间桥在细胞之间传播病毒。

1.1.5 CSFV 编码的主要蛋白

C 蛋白又称核衣壳蛋白 C，是由 99 个氨基酸残基构成的猪瘟病毒核心蛋白^[22]。C 蛋白经非结构蛋白 p23 裂解产生，具有自身蛋白酶水解活性。有研究表明，C 蛋白

参与病毒的转录,参与调节毒力大小,在病毒体内形成的核心蛋白-RNA 复合物表明了 C 蛋白的保护功能。

跨膜糖蛋白 E1 也是 CSFV 的结构蛋白, E1 蛋白通过二硫键以 E1-E2 异二聚体的形式包埋于病毒的囊膜中,不能刺激机体产生中和抗体。E1 中的两个疏水片段形成 E1 的锚,并且在内质网中新生 E0/E2 易位期间分别作为终止/开始的转移信号^[23]。

在 CSFV 编码的蛋白中, E2 蛋白是 CSFV 的主要保护性抗原^[24]。E2 蛋白由 ORF 编码的 690-1060 的 370 个氨基酸构成,其在感染细胞中分子质量为 53-55KDa^[25]。由于羧基端存在一段由约 40 个疏水氨基酸残基构成的跨膜区, E2 蛋白主要与 E1 蛋白以异源二聚体的形式存在于感染细胞或病毒粒子表面,能够诱导机体产生中和抗体^[26]。E2 蛋白还含有能刺激机体产生保护性免疫的特有抗原表位,可以参与病毒的感染过程,介导病毒进入宿主细胞。E2 被认为是 CSFV 复制必不可少的,因为存在 E2 基因部分或完全缺失的病毒突变体是不可存活的^[27]。

糖蛋白 E0 是中和抗体的第二个靶点^[28]。E0 在 1993 年被证明是对尿苷具有特异性的核糖核酸酶并且可被锌离子抑制,因此它也被称为 Erns^[29]。E0 蛋白的 N 末端为 Glu-268, C 端为 Ala-494,它由 227 个氨基酸残基组成,其甲基化程度很高,分子质量为 44-48KDa。由于与病毒包膜松散度相关, E0 并没有通过跨膜螺旋附着在膜上,而是成熟后从感染细胞中分泌出来的,并且不具有疏水性跨膜锚定结构域^[28,30,31]。然而, E0 确实具有 C 末端带电的两亲性片段,可以介导 E0 在双层膜上的易位^[32,33]。E0 不仅是一种结构蛋白,而且也是一种功能性蛋白。它可以抑制转录翻译,调节宿主细胞中 RNA 的合成,抑制宿主的阶段性免疫和诱导淋巴细胞凋亡,同时与 CSFV 对宿主细胞的嗜性以及致病力有密切关系。

Npro 是瘟疫病毒特有的一种蛋白质,也是猪瘟疫病毒基因组 ORF 编码的第一个非结构蛋白,在逃避宿主先天性免疫中起重要作用^[34]。Npro 通过其蛋白酶活性自动催化产生自己的羧基末端,其本身对于瘟疫病毒复制是不必要的,但通过干扰先天性免疫激活来发挥辅助功能。Npro 与干扰素调节因子 3 (IRF-3) 的降解相互作用,在大多数靶细胞中阻断 α -和 β -干扰素的诱导表达^[35,36]。然而, CSFV 毒力通常与 Npro 功能无关,在没有 Npro 的 IRF-3 降解功能的情况下, CSFV 依然可以维持毒力^[37]。

瘟疫病毒基因组通过合成负链全长基因组与细胞质膜紧密结合发生复制,该功能由 NS 蛋白的活性介导^[38]。非结构蛋白 NS2 被认为仅作为 NS2/NS3 自身蛋白酶起作用,这对于体内 CSFV 的高复制率是必需的。CSFV NS2 蛋白是一种疏水蛋白,定位于内质网膜,独立于 CSFV p7 肽。据研究推测, NS2 的 N-端一半是高度疏水的,并且 p7 蛋白可能含有信号序列可以将下游 NS2 蛋白导向膜。然而,该蛋白的内质网定位的膜拓扑结构和分子机制仍不清楚^[39]。

NS3 蛋白是由 683 个氨基酸组成的一种多功能蛋白,对病毒复制至关重要^[40]。NS3 的丝氨酸蛋白酶活性负责对 NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 的切割,并且需要含有 64 个氨基酸的 NS4A 蛋白作为辅助因子。另外, NS3 具有核苷三磷酸酶和 RNA 解旋酶活性,其 RNA 解旋酶活性部分含有所有解旋酶和大多数 NTP 酶的特征性核苷酸结合域^[41-44]。

编码 497 个氨基酸的病毒非结构蛋白 NS5A 是多功能蛋白质和病毒复制酶复合物的组分, 在 CSFV 生长、病毒 RNA 合成、诱导氧化应激和炎症反应中起重要作用^[45-47]。据研究发现, 位于内质网 (ER) 中的 NS5A 可以抑制位于 5' 末端非翻译区的内在核糖体进入位点 (IRES), 与 3' 端非翻译区相互作用, 诱导氧化应激, 并可与多种宿主蛋白结合来调节病毒复制^[48, 49]。NS5A 也是 CSFV C 蛋白和细胞膜联蛋白 A2 结合而组装以及产生 CSFV 感染性颗粒所必需的^[50]。此外, NS5A 可以诱导宿主细胞的自噬, 这可以增强宿主细胞中 CSFV 的病毒复制和成熟, 并可能与免疫逃避有关。

1.2 CSF 常用实验室诊断方法

以往经典急性猪瘟的爆发, 往往可以通过临床症状和病理变化做出准确判断^[51]。近年来, 猪瘟的流行特点主要转为温和型, 因此对猪瘟的鉴别主要依赖于实验室诊断。实验室诊断方法主要基于三种检测机制: (1) 观察病毒粒子。病毒颗粒可以通过电子显微镜直接观察, 这种技术被认为是病毒检测的“黄金标准”^[52]。该技术的优点是直接检测 CSFV, 但设备昂贵且观察仅限于研究机构。(2) 免疫诊断技术。作为抗原, CSFV 可刺激宿主的免疫系统产生抗体, 也可被特异性抗体中和。基于抗原-抗体结合的特征, 已经设计了许多利用酶联免疫吸附反应 (ELISA) 来检测 CSFV 的方法^[53, 54]。

(3) 病毒核酸的检测。作为黄病毒科中的瘟病毒, CSFV 具有约 12,300 个碱基的单链 RNA 基因组, 可在感染后可被立即检测到。因此, 近年来研究人员使用不同的技术检测了特定的 CSFV RNA 序列, 如 PCR^[55]和荧光定量 PCR^[56]。这些方法通过检测特定核苷酸定量分析病毒核酸, 并大大提高这些方法检测 CSFV 的灵敏度。基于检测机制和临床实用性, 实验室常用的诊断方法主要有 RT-PCR 检测, 实时荧光定量 PCR 检测, 免疫胶体金检测, ELISA 检测, LAMP 检测。

1.2.1 RT-PCR 检测

RT-PCR 即逆转录 PCR, 是以组织中提取的总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板来对目的片段进行扩增以检测病原的一种方法。该方法操作简单, 灵敏度和安全性高, 为猪瘟病毒的快速诊断提供了便利。经典的 RT-PCR 被证明是一种敏感和特异的诊断工具。Liu 等用 RT-PCR 方法检测感染组织中的 CSFV, 其敏感性达到 10^{-4} TCID₅₀, 当利用巢式 RT-PCR 进行检测时, 敏感度可提高 1000 倍^[57]。刘梅芳等建立的巢式 RT-PCR 对 35 份临床样品进行了检测, 测序结果显示成功鉴定出 19 份阳性样品^[58]。谭飞等建立的 CSFV 与 PEDV 双重 RT-PCR 可以检测到 CSFV 与 PEDV 模板最大稀释倍数为 1×10^7 , 其中 CSFV 的最小核酸检出量为 13pg, PEDV 的最小病毒核酸检出量为 11pg^[59]。陈静等建立的关于猪瘟和牛病毒性腹泻双重 RT-PCR, 特异性地将存在交叉反应的 CSFV 和 BVDV 进行了区分^[60]。Zhao 等建立了可以检测 CSFV, PRRSV, TGEV 和 PEDV 四种不同 RNA 病毒的多重 RT-PCR 方法, 临床结果显

示该方法敏感性和特异性都较好,能同时有效的检测临床样本^[61]。由此可以发现,RT-PCR 技术为 CSFV 的检疫和诊断提供了一种特异灵敏的方法。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 是基于 PCR 技术发展起来的一种高度灵敏的分子生物学定量检测技术。RT-PCR 被证明是一种灵敏且特异的诊断工具,但凝胶系统检测扩增的 PCR 产物存在交叉污染的风险,且不能精确定量基因组拷贝数^[62-65]。通过荧光探针的引入,可以实时检测序列特异性模板,通过固有的杂交反应确保特异性,避免交叉污染。Hofmann 描述了用于检测 CSF 的实时 RT-PCR,其中含有 5' NTR BVDV 的嵌合 CSFV 被用作通用阳性对照^[66]。Le Potier 等利用猪瘟疫荧光定量 RT-PCR 方法对大量临床样品进行了检测,结果显示荧光定量 RT-PCR 方法敏感、特异、快速、高通量^[67]。王淑娟等建立的荧光定量 PCR 对临床病料的检测结果显示与巢式 PCR 的吻合率可达 100%^[68]。高飞等针对 E2 蛋白建立的荧光定量 PCR 方法能检测到相当于 10 copies/ μ L 的病毒核酸,且变异系数小于 1%^[69]。荧光定量 PCR 方法可靠、敏感、特异,作为猪瘟疫病毒诊断方法中的领先技术,可广泛用以猪瘟疫的诊断与流行病学调查。

1.2.3 免疫胶体金检测

免疫胶体金技术是一种基于抗原抗体反应的新型检测技术。Li 等基于 CnC2 嵌合蛋白,开发免疫层析条带以快速评估接种 CSFV 疫苗的猪血清样品的抗体滴度。用作检测器的嵌合蛋白用胶体金标记。将葡萄球菌蛋白 A (SPA) 和抗 CnC2 单克隆抗体 (mAb) 分别印迹到硝酸纤维素膜上作为测试线和对照线。测定条带的灵敏度为 97.0%,特异性为 100%^[70]。王向鹏将标记纯化的抗 CSFV E0 单克隆抗体 E01 作为捕捉抗体,将纯化的抗 CSFV E0 单克隆抗体 E02 和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和质控线,组装了双抗夹心法 CSFV 胶体金免疫层析试纸条,该试纸条可检测出纯化的 CSFV,并有明显显色^[71]。胶体金技术简单、快速、灵敏,不需要精密仪器和辅助试剂,肉眼便可观察到结果。适合基层进行批量检测和疫病普查。

1.2.4 ELISA 方法检测

酶联免疫吸附试验是基于抗原抗体特异性反应结合酶标技术来进行检测的一种技术^[72]。由于该方法的一系列优点,在猪瘟疫的临床检测和抗体监测等方面得到了广泛的应用。汤赛冬等用提纯的高生物活性 CSFV 抗体及兔抗 CSFV 血清作为包被抗体和酶标抗体,建立了双抗体夹心 ELISA,用于检测 CSFV 抗原,同时用进口商品化 ELISA 检测试剂盒检测 45 份可疑样品,发现阳性结果符合率可达 95%以上^[73]。李文良等基于 E2 主要抗原区基因经大肠杆菌表达并纯化后的重组蛋白作为包被抗原,建立了间接 ELISA 方法^[74]。吴素丽等基于大肠杆菌表达的 CSFV 重组 E0 蛋白,建

立了检测猪瘟抗体的间接 ELISA 方法，取得了较好的效果^[75]。由于其较高的灵敏性和特异性以及可批量检测的特点，ELISA 方法适用于大规模猪场的血清学检测，也是净化猪瘟的重要技术手段。

1.2.5 LAMP 检测

环介导等温扩增技术（LAMP）是一项新兴的基因扩增技术。与病毒分离和实时 RT-PCR 相比，LAMP 方法可以在恒定温度下扩增特定的基因片段，反应过程中还产生大量副产物焦磷酸根离子，导致反应混合物中焦磷酸镁的白色沉淀。由于沉淀产生的反应混合物浊度的增加与合成的 DNA 量相关，可以基于浊度的变化来实现 LAMP 反应的实时监测，因此更适用于野外应用^[76, 77]。CHEN 等使用一组六个引物（两个外引物，两个内引物和两个环引物）一小时内等温条件（63℃）下扩增 CSFV 的基因组 RNA。该 RT-LAMP 测定法显示出比标准 RT-PCR 方法高 100 倍的灵敏度，并且鉴定了通过 RT-PCR 测试时阳性的 18 个阳性病例^[78]。Postel 等使用来自实验感染古巴毒力株 CSF0705'Margarita'的两组猪和最近的田间分离株 CSF1058'Pinar del Rio'的参考血清检查诊断测试灵敏度，可靠地检测到来自古巴三个不同地区的最新分离物，其分析灵敏度比定量逆转录 RTqPCR 低 10-100 倍^[79]。曲光刚等根据 CSFV 5' 端保守基因设计了 6 条特异物，RT-LAMP 对 CSFV 的最低检测量为 1×10^1 个基因拷贝，是常规 RT-PCR 敏感度的 100 倍^[80]。赵明秋等通过对 GenBank 中登录的 CSFV 序列进行比对分析，依据 CSFV Npro/ C 基因中的保守区域，设计合成了一套 RT-LAMP 引物，最低可检测出 0.1pg/ μ L 浓度的 CSFV RNA^[81]。这些结果表明，CSFV RT-LAMP 检测是一种经济有效的检测工具，对于发展中国家的经典猪瘟的快速临床前检测和监测具有潜在的用途。

1.3 CSFV 疫苗研究进展

猪瘟作为 OIE 规定的重大传染病之一，许多国家实施了控制和根除计划^[82]。然而，由于生猪贸易和运输的全球化及集约化，许多地区猪密度的增加，作为 CSFV 储存库的野猪数量的增加，CSF 将继续成为世界范围内的严重威胁。因此，除欧盟外的许多国家通过接种疫苗来控制或试图根除 CSFV。在当下，研制和使用安全有效的疫苗，仍是各个国家亟待解决的问题^[83]。研究方向主要集中在弱毒疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗、合成肽疫苗以及活载体疫苗等方向。

1.3.1 弱毒疫苗

弱毒疫苗是指一种通过自然筛选或人工致弱等方法使病原致病力减弱但仍使其具有活力的完整病原疫苗。目前世界上广泛使用的猪瘟疫苗仍以弱毒疫苗为主，通常是基于我国的猪瘟兔化弱毒疫苗（C 株）、日本 GPE-株以及法国的 Thiveral 菌株^[84]。

C 株由我国自主研发, 自 1956 年由国内开始推广使用后, 便为世界范围内的猪瘟疫防治做出了重大贡献。世界各国通过疫苗接种-攻击试验等对弱毒疫苗的免疫效果和安全性作了进一步研究, 来自实验室研究的大多数数据表明, 无论所使用的攻击毒株如何, 在攻击后对临床症状的发展都能提供相对高水平的保护^[85]。免疫疫苗后, 机体可在短时间内产生足够的抗体, 免疫保护可持续 6-18 个月甚至终生。尽管有研究报道一些减毒活疫苗会发生垂直传播穿过胎盘屏障, 但对妊娠和胎儿没有负面影响^[86]。猪瘟疫弱毒疫苗也有一定的缺点, 如它们诱导的抗体反应不能与 CSFV 感染后的抗体反应区别开来, 各种原因引起的免疫失败现象也时常发生^[87, 88]。这也是目前迫切需要开发新型 CSF 疫苗的重要原因。

1.3.2 亚单位疫苗

基因工程亚单位疫苗是指将保护性抗原基因在原核或真核细胞中表达的蛋白作为抗原, 联合佐剂制成的疫苗。亚单位疫苗具有安全性和稳定性好的特点, 不存在突变或者与野毒发生重组使其毒力返强的危险, 且能够用检测针对其他蛋白的抗体的 ELISA 进行感染猪和接种疫苗的猪之间的区分。猪瘟疫 E2 亚单位疫苗一般基于杆状病毒重组系统中 CSFV 的 E2 蛋白的表达^[89]。由于基因的跨膜区已被删除, 蛋白质被高水平分泌到昆虫细胞培养物的上清液中, 随后将杆状病毒灭活, 然后用水-油-水乳液佐剂化 E2 蛋白^[90]。目前由德国拜耳医药开发制造的 BAYOVAC®CSFMarker 和荷兰英特威公司的 Porcilis®Pesti E2 亚单位疫苗已经商品化^[91], 现国内也有相关的研究成果可用于临床。相对于弱毒疫苗, 亚单位疫苗免疫原性较弱, 需二次免疫后机体才能进行充分的免疫保护^[92]。E2 亚单位疫苗具有灭活疫苗的一般安全优势, 并且除注射部位的一些局部组织反应外, 确实已被证明是安全的^[93-95]。整体来说, E2 亚单位疫苗为未来防制猪瘟疫提供了良好的前景。

1.3.3 核酸疫苗

核酸疫苗, 是指将编码某种抗原蛋白的外源基因(DNA 或 RNA)直接导入动物体细胞内, 并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答的一类疫苗。与传统疫苗相比, 核酸疫苗免疫保护力更强, 制备简单且安全性更高, 免疫应答更持久, 易于储存和运输, 具有更高的稳定性。目前, 所有的 DNA 疫苗都是基于表达 CSFV E2 蛋白的质粒来构建的, 标记物则是基于 Erns 或 NS3 特异性抗体的检测。DNA 疫苗一般利用细胞因子或细胞表面分子的基因共表达以增强其免疫原性。Li 等测试了跨膜蛋白分子 CD81 在改善基于 E2 的 DNA 疫苗的免疫应答方面的作用, CD81 的加入能显著提高机体的免疫应答^[96]。周鹏程等构建了猪瘟疫病毒 E2 基因真核表达载体 pcE2, 使之在体外真核细胞中进行了瞬时表达, 免疫小鼠后成功诱导小鼠产生了抗 E2 蛋白的抗体^[97]。然而为了保护猪免受高毒力 CSFV 的攻击感染, 仍然需要高剂量和多次接种。因此, 与 DNA 制备相关的高成本以及低效递送使

得该疫苗在目前的猪群生产中可行性较低，这也为核酸疫苗的进一步研发提供了更大的挑战^[98]。

1.3.4 合成肽疫苗

合成肽疫苗是利用人工方法按天然蛋白质的氨基酸顺序合成保护性短肽，与载体连接后加佐剂所制成的一种仅含免疫决定簇组分的标记疫苗。与亚单位疫苗一样，合成肽疫苗安全性较高，因为它们不涉及病毒的复制^[86]。合成肽疫苗包括单肽疫苗和多肽疫苗，E2 蛋白是自然 CSFV 感染期间中和抗体的主要靶标，并且它是 CSFV DIVA 疫苗设计的主要成分^[99-101]。已经提出了几种对应于 E2 的 A 或 BC 结构域的不同区域的免疫原性线性肽，并且在单肽或多肽制剂中用作针对 CSFV 的疫苗^[102-105]。该类疫苗可配合 E0 特异性抗体的检测来达到区分疫苗抗体与野毒抗体的目的。然而，合成肽疫苗需要肠胃外给药，佐剂和多种疫苗接种方案，不符合我国养猪业现状的需求。并且在大多数情况下，合成肽疫苗虽能引发一定水平的中和抗体，但未能诱导针对临床疾病，病毒血症和病毒脱落的完全保护^[106, 107]。

1.3.5 活载体疫苗

活载体疫苗是将编码病原体有效免疫原的基因插入载体基因组中，接种后，随着体内疫苗株的增殖，大量所需的抗原得以表达，通过引发针对插入的抗原的体液和细胞免疫应答来达到免疫目的。一些对宿主无害的减毒活病毒可以作为外源免疫原性抗原的传递载体，使靶基因在宿主体内获得持久表达。因为重组病毒中仅包含 CSFV 的一小部分基因组信息，所以免疫动物中的抗体模式与感染动物中的抗体模式完全不同。因此，通过 ELISA 可以很容易地区分感染者和接种疫苗的个体^[91]。迄今为止，候选 CSF 疫苗中使用的病毒载体包括伪狂犬病病毒（PRV），痘病毒，牛病毒性腹泻病毒（BVDV）和猪腺病毒（PA₂V）^[86]。早在 1991 年，Rümenapf 等已经构建了表达结构蛋白或仅表达 CSFV E2 基因的病毒载体，并发现它们可诱导保护性免疫，但是需要高滴度和静脉内施用^[108, 109]。Hammond 等发现使用质粒进行初免-加强免疫接种并随后施用表达 CSFV E2 基因的重组猪腺病毒能够在断奶仔猪中诱导保护性免疫，但只有 75% 的断奶仔猪免于疾病^[110]。总之，上面提到的一些活载体疫苗是能够提供全面保护。然而，都缺少来自疫苗接种试验的可靠数据，特别是关于针对病毒载体的免疫力，加上某些载体的存在可能干扰血清学监测程序，使得活载体疫苗并没有得到临床应用。

1.4 研究目的与意义

中国是一个传统的农业大国，生猪饲养历史悠久。近年来我国养猪业发展较快，但总体水平不高，由猪瘟导致的猪群死亡仍然占相当一部分比例，给我国的养殖业带来了巨大的资源浪费。

我国目前控制 CSF 流行的主要策略依然是预防接种活疫苗，其中弱毒疫苗对该病的控制起到了很大的积极作用^[84]。由于单纯依接种靠弱毒疫苗来净化猪瘟面临一定的困难，标记疫苗的开发及其鉴别诊断方法的研究是未来我国控制并净化 CSF 的关键^[111]。E2 亚单位疫苗是最早投入使用也是当前惟一投入使用的猪瘟标记疫苗，其不仅能够对抗 CSFV 野毒株，而且很容易通过检测抗 E0 蛋白的抗体将免疫猪和感染猪区分开来^[89, 112-114]。

本试验在 E2 亚单位疫苗的基础上，选择猪瘟 E0、E2 蛋白优势抗原表位，将 E0、E2 基因与载体连接后转入大肠杆菌并进行了高效表达，通过 Western-blotting 试验测定了其反应原性，随后建立了基于猪瘟 E0、E2 蛋白的间接 ELISA 方法。这初步为 E2 亚单位疫苗的推广和应用提供了配套的检测方法，也为进一步开发诊断试剂盒及净化猪瘟奠定了基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 病料与血清

CSFV 阳性病料于 2018 年采集于河北深州某猪场由实验室保存。阴阳性血清及 279 份猪临床血清样品均由河北农业大学动物医学院兽医微生物实验室保存。

2.1.2 主要仪器

表 1 主要仪器列表
Table 1 Main instrument list

名称	生产厂家	型号
PCR 热循环仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司	T100
稳压稳流电泳仪	北京六一仪器厂	DYY-8C
恒温恒湿培养箱	宁波江南仪器厂	HWS-280
全温振荡培养箱	太仓市豪成实验仪器制造有限公司	HZQ-F100
高电流电泳仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司	1645052
半干转印槽	伯乐生命医学产品（上海）有限公司	Trans-Blot-SD
凝胶成像系统	伯乐生命医学产品（上海）有限公司	GELDOC-2000
手提式压力蒸汽灭菌器	河北中兴伟业实验仪器有限公司	YX-28B
超微量分光光度计	赛默飞世尔科技（中国）有限公司	ND-2000C
酶标仪	赛默飞世尔科技（中国）有限公司	FC
高速冷冻离心机	上海力申科学仪器有限公司	Neofuge 13R

2.1.3 试验所用溶液

琼脂糖凝胶电泳所用溶液，原核表达用溶液，SDS-PAGE 所用溶液，Western-blotting 实验用溶液，ELISA 用试剂配置方法参见论文《猪丁型冠状病毒 HB-BD 株分离鉴定及生物学特性》^[115]。

2.1.4 其他相关试验材料

表 2 主要试剂列表

Table 2 Main reagent list

试剂名称	生产厂家
异丙醇	天津市进丰化工有限公司
氯仿	天津市进丰化工有限公司
Trizol Reagent	Takara Dalian
2×Es Taq MasterMix	北京康为世纪生物科技有限公司
DL2000 DNA Marker	Takara Dalian
DL5000 DNA Marker	Takara Dalian
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
PMD19-T Vector	Takara Dalian
<i>EcoRI</i> 、 <i>XhoI</i>	Takara Dalian
原核表达载体 pET 32a (+)	河北农业大学微生物实验室
T4 DNA 连接酶	Takara Dalian
质粒小提试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
<i>E.coli</i> DH5α 和 BL21 (DE3) 菌株	北京全式金生物有限公司
His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白)	北京康为世纪生物科技有限公司
30%丙烯酰胺	美国 BIOMIGA 公司
5×SDS 上样缓冲液	北京索莱宝生物科技有限公司
NC 膜	北京索莱宝生物科技有限公司
Blue Plus Protein Marker	北京全式金生物有限公司
胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
新牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
BSA	广州赛国生物科技有限公司
兔抗猪 IgG/HRP	北京博奥龙免疫技术有限公司
DAB 显色液	北京索莱宝生物科技有限公司
10XPBS 缓冲液	北京索莱宝生物科技有限公司
TMB 显色液	北京索莱宝生物科技有限公司

2.2 方法

2.2.1 CSFV E0、E2 基因的克隆扩增及重组表达质粒的构建

2.2.1.1 引物的设计

通过分析 E0 及 E2 蛋白的优势抗原表位区, 利用生物学软件 Primer5.0 软件设计一对特异性表达引物, 其中上下游引物 5' 端分别引入酶切位点 (上游 *EcoRI*、下游 *XhoI*), 并加入保护性碱基 (下划线部分为保护性碱基和酶切位点序列)。引物序列分别为:

E0 表达引物

P1 5-CCGGAATTCGAAAATATAACTCAATGG-3P2 5-CCGCTCGAGGGCATAGGCACCAAACCA-3

E2 表达引物

P3 5-CCGGAATTCACAACCCTGAGAACAGAA-3P4 5-CCGCTCGAGTTGGTACTCGCCCTTAAG-3

将上述引物送至生工生物工程有限责任公司合成。

2.2.1.2 CSFV 核酸的提取与反转录

基因组 RNA 的提取方法参见《小干扰 RNA 抑制猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞内的复制》^[116]。

以提取的总 RNA 为模板，构建 20 μ L 反转录体系

RNA 模板	8 μ L
dNTP Mixture	1 μ L
Oligo dT Primer	1 μ L
65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 3 min	
RNase free dH ₂ O	4.5 μ L
PrimeScript RTase	1 μ L
RNase Inhibitor	0.5 μ L
5X PrimeScript Buffer	4 μ L
<hr/>	
总体系	20 μ L

将体系置 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 70 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。反应完成后，产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.1.3 CSFV E0 和 E2 基因片段扩增与纯化

cDNA 模板	2 μ L
2 x Es Taq MasterMix	6 μ L
上游引物 (P1/P3)	1 μ L
下游引物 (P2/P4)	1 μ L
灭菌蒸馏水	6 μ L
<hr/>	
总体系	20 μ L

将上述试剂依次加完混匀后，按照以下条件进行 PCR 扩增：

E0 基因 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

E2 基因 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

反应完成后，取产物，使用 1.5% 琼脂糖进行检测。按 (BIOMIGA) 快速琼脂糖

凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行操作（附录 A），对 PCR 产物进行胶回收。

2.2.1.4 CSFV E0 和 E2 基因与克隆载体的连接

将纯化回收后得到的 E0 和 E2 基因 DNA 片段与载体 pMD19-T 构建 10 μ L 连接体系，连接产物命名为 pMD19T-E0、pMD19T-E2。

Ligation Solution I	5.0 μ L
PCR 回收产物	4.5 μ L
pMD19-T Vector	0.5 μ L
总体系	10 μ L

将该体系吹吸混匀后，于 16 $^{\circ}$ C 水浴锅中连接过夜。连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，具体方法参见论文《猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测的建立及 PCV2 单克隆抗体的制备》^[117]。

2.2.1.5 PMD19T-E0、PMD19T-E2 质粒的提取及序列测定

挑取单个菌落至 5 mL 含有千分之一 AMP⁺ 的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 振摇培养（200 r/min）16 h。重组质粒的提取步骤参见高纯度质粒小提取试剂盒说明书（附录 B）。

对鉴定正确的阳性重组克隆菌使用浓度为 60 % 的甘油 LB 保存至 1.5 mL 离心管中，送北京中科希林生物技术有限责任公司进行序列测定。将得到的基因序列使用软件与 GenBank 中相应的基因序列进行比较分析。

2.2.1.6 重组质粒 PMD19T-E0、PMD19T-E2 与 pET32a 表达载体的酶切与纯化回收

建立双酶切反应体系，将表达载体与重组质粒分别进行双酶切

pET32a/ pMD19T-E0/pMD19T-E2	12 μ L
ddH ₂ O	4 μ L
<i>Eco</i> RI	1 μ L
<i>Xho</i> I	1 μ L
10 \times buffer H	2 μ L
总体系	20 μ L

将上述体系置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 3 h，反应完全后，利用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行酶切产物的鉴定。鉴定成功的线性表达载体与目的基因分别纯化回收（BIOMIG 琼脂糖凝胶回收试剂盒）。

2.2.1.7 E0、E2 基因与原核表达载体的连接与转化

将回收后的目的基因与原核表达载体 pET32a 进行连接，构建的重组表达质粒命名为 pET32a-E0、pET32a-E2，建立的 10 μ L 连接反应体系如下：

pET32a 线性载体	5 μ L
回收的 E0/E2 基因	3 μ L
10 \times T4 DNA 连接酶 Buffer	1 μ L
T4 DNA 连接酶	1 μ L
总体系	10 μ L

将混匀后的体系置于 16 $^{\circ}$ C 连接 3 h，连接产物转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中。操作步骤见 2.2.1.4。

2.2.1.8 重组质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的双酶切鉴定

按照步骤 2.2.1.5 提取重组质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 后，按照 2.2.1.6 构建 20 μ L 双酶切体系以进行双酶切鉴定。

2.2.2 重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的表达、鉴定与纯化

2.2.2.1 重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的诱导表达

挑取单个阳性菌落，接种于 LB 液体 (AMP⁺) 培养基中，37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 2.5 h 至 OD_{600nm} 到达 0.6-0.7，加入千分之一的诱导剂 IPTG (100mM) 继续诱导培养，并分别于诱导前和诱导后 1、2、4、6 h 时取菌，在有空载体菌做对照的情况下检测 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白不同时间段的表达量情况。

2.2.2.2 重组蛋白的表达形式鉴定

将 100 mL 菌液置于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中 200 r/min 振荡培养至 OD_{600nm} 为 0.6~0.7 时，加入千分之一的诱导剂 IPTG (100mM) 继续诱导 6 h 后离心，收集沉淀加入菌体裂解液充分混匀，于冰上静置 10 min 后进行超声波裂解约 30 min。待菌液清亮后，12000 r/min (4 $^{\circ}$ C) 离心 10 min，分别收集包涵体沉淀和可溶性上清进行 SDS-PAGE 电泳以检测蛋白的表达形式。

2.2.2.3 重组蛋白 pET32a-E0、pET32a-E2 的纯化

将沉淀用含有尿素的 Tris-HCl 洗涤后重悬于 4 mL Binding Buffer 中，尽量混匀使

包涵体充分溶解。按照康为世纪的 His 标签蛋白纯化试剂盒（包涵体蛋白）进行蛋白的纯化。

- 1) 向层析柱中加入 2 mL 填料，经过 10 min 的静置沉淀后打开出液口使乙醇流出。
- 2) 依次用 5 mL 的去离子水和 8 mL 的 Binding Buffer 平衡层析柱。
- 3) 将 Binding Buffer 溶解完全的包涵体于 4°C 下 10000r/min 离心 15 min，收集上清。
- 4) 用 1 mL 注射器缓慢地将上清负载上柱，收集流穿液。
- 5) 使用 15 mL 的 Binding Buffer 冲洗柱子以冲去无关杂蛋白。
- 6) 使用 4 mL Elution Buffer 以每管 1 mL 的洗脱峰洗脱目的蛋白，收集 4 管。
- 7) 洗脱后，依次使用 5 mL 的 Binding Buffer，5 mL 的去离子水洗涤柱子。最后用 3 mL 的 20%乙醇加入到层析柱中，待其完全浸没填料后封柱。

2.2.2.4 重组蛋白的 Western-blotting 分析

将纯化后的重组经 SDS-PAGE 电泳后使用湿转法转印到 NC 膜上。4°C 封闭 8 h（封闭液为 5% TBST 稀释的脱脂牛奶），次日加入 200 倍稀释的 CSFV 阳性血清，室温作用 2 h 后，将培养皿置于摇床上用 TBST-TBS 交替洗膜 3 次，每次 5 min，加入 1:1500 稀释的兔抗猪 IgG-HRP，室温条件下置摇床上震荡孵育 2 h 后再次用 TBST-TBS 交替洗膜 3 次，每次 5 min。在避光处将 NC 膜经 DAB 显色直至条带清晰后用蒸馏水冲洗终止显色反应。

2.2.3 pET32a-E0、pET32a-E2 重组蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.3.1 重组蛋白最佳稀释倍数和血清最佳稀释倍数确定

在 96 孔板上进行方阵试验，即将纯化效果好的 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白利用 NanoDrop 2000 进行浓度测定，随后根据所测定的浓度分别用碳酸盐缓冲包被液在浓度范围内（pET32a-E0 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pET32a-E2 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）进行倍比稀释，每个孔中加入包被液稀释的蛋白 100 μL ，将反应板在 37°C 恒温孵育 2 h 后 4°C 放置过夜。包被完成后用 PBST 清洗包被板，每次加液 250 μL 静置 2 min 后进行洗涤，重复 4 次后拍干；加入含 5% 胎牛血清的 PBST 封闭液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37°C 封闭 1 h，弃去封闭液，进行洗板；然后将阴、阳性血清按比例（pET32a-E0 1:25、pET32a-E2 1:20）进行倍比稀释后与包被好的蛋白组成方阵，每孔加入 100 μL ，将 96 孔板置于 37°C 恒温箱中反应 1 h；孵育完毕后每孔加入 250 μL PBST 静置 2 min 后进行洗涤，以上操作重复 4 次后拍干；每孔加入 100 μL 用抗体稀释液稀释好的（1:20000）兔抗猪 IgG-HRP，将反应板在 37°C 恒温箱中孵育 1 h；随后用 PBST 按照上述方法再次洗板；将 100 μL TMB 显色液加入 96 孔微量反应板的孔中，于室温避光

处静置 10 min 后加入 50 μ L 2 mol/L 的硫酸溶液以终止反应。用酶标仪在 450nm 波长条件下测定值。一抗血清的最适稀释倍数和蛋白最适包被浓度的判定标准阳性 OD_{450nm} 值/阴性 OD_{450nm} 值（P/N）的比值最大而且阳性血清 OD_{450nm} 值接近 1.0。

2.2.3.3 最适封闭液的确定

在仅用封闭液作为变量进行变化的情况下，将两种蛋白分别用 2.2.3.1 所确定的蛋白浓度进行包被。设置 4 组封闭液，即 5%脱脂牛奶、5%胎牛血清、5%新牛血清和 1% 的 BSA。分别用 2.2.3.1 所确定的最佳稀释倍数进行血清的稀释，按操作步骤 2.2.3.1 进行操作。最合适的封闭液的判定标准应该是阴性血清的 OD_{450nm} 值接近 1.0 且 P/N 值最大。

2.2.3.2 包被时间的确定

按照 2.2.3.1 所确定的蛋白包被浓度分别对 pET32a-E0 和 pET32a-E2 重组蛋白进行包被，将包被条件做为调整变量，设置四个不同的包被时间，条件分别为 4℃环境下放置过夜、37℃环境下恒温反应 1 h、37℃恒温反应 2 h、37℃恒温作用 2 h 后 4℃放置过夜，其余步骤与 2.2.3.1 相同，按照 2.2.3.2 所确定的最佳封闭液进行封闭，按之前所确定的稀释倍数对阴阳性血清进行稀释，最佳包被时间通过酶标仪测定的不同包被条件下的 OD_{450nm} 值以及最大的 P/N 值来确定。

2.2.3.4 酶标二抗稀释浓度的确定

按照 2.2.3.1 所确定的最佳抗原浓度包被 pET32a-E0 和 pET32a-E2 重组蛋白，按照 2.2.3.2 确定的最佳包被时间进行包被，用 2.2.3.3 确定的最适封闭液进行封闭，阴阳性血清按 2.2.3.1 所确定的最佳稀释倍数进行稀释，将兔抗猪 IgG-HRP 分别稀释 10000 倍，20000 倍，30000 倍和 40000 倍按 2.2.3.1 的操作步骤进行检测。通过不同酶标二抗稀释度下的阴阳性血清 OD_{450nm} 值及 P/N 值大小来确定最适稀释倍数。

2.2.3.5 底物最佳显色时间

蛋白包被浓度、封闭液的使用以及阴阳血清的稀释倍数和酶标二抗最佳作用浓度按照 2.2.3.1、2.2.3.2、2.2.3.3 和 2.2.3.4 所确定的进行。将 TMB 单组份显色液的作用时间作为变量设置四个不同的反应时间，分别于室温避光处分别反应 10 min、15 min、20 min、25 min，具体操作步骤同 2.2.3.1。底物最佳作用时间的确定通过分析比较不同条件下的 OD_{450nm} 值和 P/N 值大小来确定。

2.2.3.6 ELISA 方法临界值的确定

按初步建立的 ELISA 方法对 30 份用爱德仕猪瘟 ELISA 检测试剂盒判定为阴性的猪血清（实验室保存）进行检测，利用 Excel 表格处理所得到的 OD_{450nm} 值数据，计算得出阴性对照的平均值（ \bar{X} ）和阴性对照的标准差（SD）。根据统计学原理，当检测样品的 OD_{450nm} 值 $< \bar{X} + 3 \times SD$ ，就可以判定血清抗体为阴性；当检测样品的 OD_{450nm} 值 $\geq \bar{X} + 3 \times SD$ 时，就可以判定血清抗体为阳性。

2.2.3.7 重复性试验

为检验所建立间接 ELISA 方法的重复性，取 5 份不同的 CSFV 血清在同一 96 孔酶标反应板上进行平行实验，每个血清样品重复包被 3 孔；再取 5 份不同的 CSFV 血清在 3 块不同的 96 孔板上进行平行实验，分别统计并分析 OD_{450nm} 值，通过利用 Excel 表格计算 CSFV 血清的批内/批间重复试验的变异系数来判断重复性是否良好。

2.2.3.8 特异性试验

利用已建立的间接 ELISA 方法，分别以 PEDV、PRRSV、PRV、FMDV、PCV2 阳性血清以及 CSFV 阴、阳性血清作为一抗血清进行反应，每个样品重复 3 个孔，分析各个样品的 OD_{450nm} 均值来检验对本研究所建立的 CSFV pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 方法的特异性。

2.2.3.9 临床样品的检测

用建立的 ELISA 检测方法对来自河北省各个地区猪场的仅注射 E2 亚单位疫苗的 158 份猪血清和 121 份注射弱毒疫苗的猪血清进行检测。将检测结果与爱德仕猪瘟检测标准试剂盒进行比对分析，以分析所建立 ELISA 方法与爱德仕猪瘟检测试剂盒的符合率及猪瘟野毒感染情况。

3 结果

3.1 CSFV E0、E2 基因的扩增及鉴定

根据 E0 和 E2 的优势抗原表位所设计的特异性表达引物，经过 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳后得到与预期目的条带大小相一致的结果（约 699 bp 和约 558 bp）（图 1）；序列测定结果亦显示与 GenBank 中登录的 CSFV E0 和 E2 基因的相应序列一致的序列（附录 C、附录 D）。

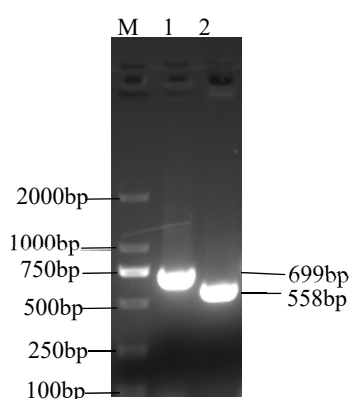


图 1.CSFV E0 和 E2 基因表达引物的 PCR 扩增

Figure.1 PCR amplification of CSFV E0 and E2 gene expression primers

M : DL2000 1:CSFV-E0 基因 2: CSFV-E2 基因

M : DL2000 1: gene of CSFV-E0 2: gene of CSFV-E2

3.2 CSFV E0、E2 基因的原核表达

3.2.1 重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2 的鉴定及表达

对转入宿主菌后提取的重组表达质粒 pET32a-E0、pET32a-E2，利用 *EcoRI*、*XhoI* 两种限制性内切酶进行双酶切鉴定后，分别得到线性载体（约 5 900 bp）和目的基因（E0 约 699 bp、E2 约 558 bp）两条条带（图 2），说明重组质粒构建成功。

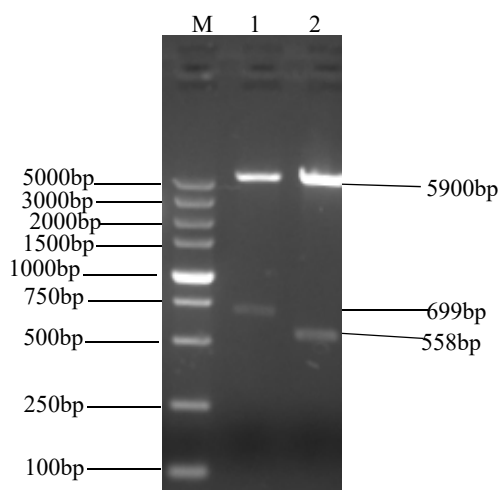


图 2.重组质粒的酶切鉴定

Figure.2 Enzyme digestion of recombinant plasmid

M: DL5000 1: pET32a-E0 酶切产物 2: pET32a-E2 酶切产物

M: DL5000 1: enzyme-digested of pET32a-E0 2: enzyme-digested of pET32a-E2

对 pET32a-E0、pET32a-E2 重组载体的诱导表达结果与分时间段取样的蛋白 SDS-PAGE 结果如图 3、图 4 所示，诱导后可见有预期大小相符的蛋白大量表达（pET32a-E0 约 45KDa、pET32a-E2 约 40KDa）；对不同时间段取样检测的结果可见 6 h 时表达量均大于其他时间段的表达量，可作为两蛋白的适合诱导时间。

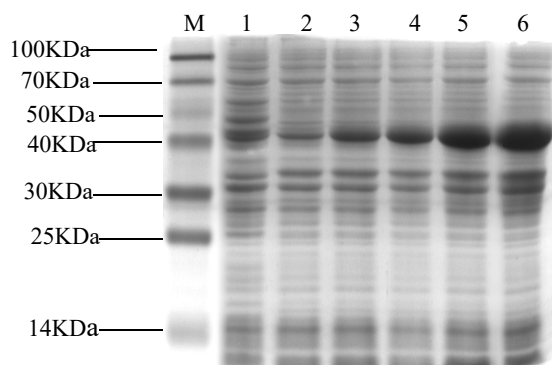


图 3.重组蛋白 pET32a-E0 不同诱导时间的 SDS-PAGE 检测

Figure.3 SDS-PAGE detection of pET32a-E0 at different induction times

M: 蛋白 Maker 1-6: pET32a 载体、诱导 0、1、2、4、6 h 的重组菌 pET32a-E0

M: Protein Maker 1-6: pET32a vector Inducing 0, 1, 2, 4, 6 h pET32a-E0 recombinant bacteria

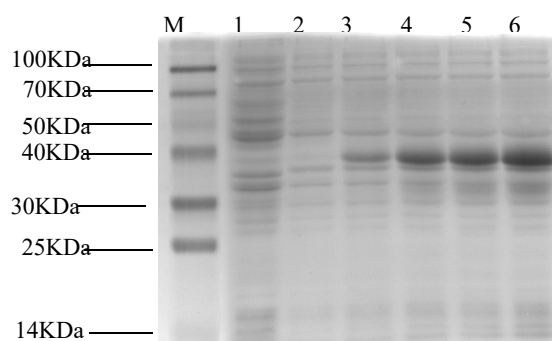


图 4.重组蛋白 pET32a-E2 不同诱导时间的 SDS-PAGE 检测

Figure.4 SDS-PAGE detection of pET32a-E2 at different induction times

M: 蛋白 Maker 1-6: pET32a 空载体 诱导 0、1、2、4、6 h 的重组菌 pET32a-E2

M: Protein Maker 1: PET32a vector , Inducing 0, 1, 2, 4, 6 h pET32a-E2 recombinant bacteria

3.2.2 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白的可溶性鉴定

对在合适条件下进行诱导表达的 pET32a-E0 和 pET32a-E2 菌液进行冰上超声裂解，裂解完全后进行离心，分别对收集的可溶性上清和包涵体沉淀进行 SDS-PAGE 检测，由（图 5、图 6）可以看出沉淀中的目的蛋白含量明显多于上清，说明重组蛋白 pET32a-E0、pET32a-E2 主要于包涵体中大量表达。

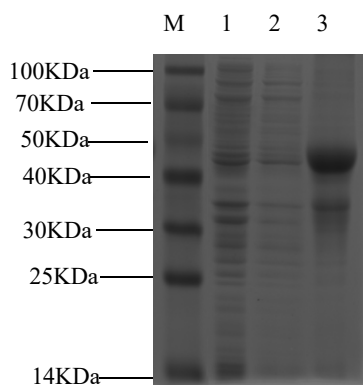


图 5.pET32a-E0 重组蛋白的可溶性检测

Figure.5 Soluble detection of recombinant protein pET32a-E0.

M: 蛋白 Maker 1: pet32a 空载体 2:可溶性上清 3:包涵体沉淀

M: Protein Maker 1: pET32a vector 2: Soluble supernatant 3: Inclusion body precipitation.

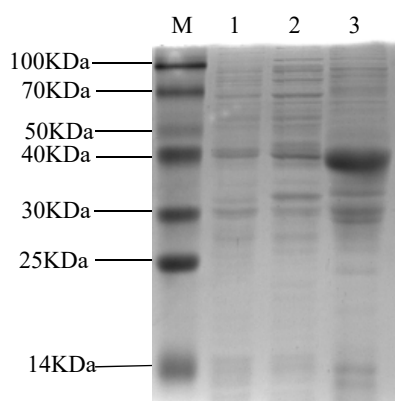


图 6. pET32a-E2 重组蛋白的可溶性检测

Figure.6 Detection of pET32a-E2 protein expression patterns

M: 蛋白 Maker 1: pET32a 空载体 2:可溶性上清 3:包涵体沉淀

M: Protein Maker 1: pET32a empty vector 2: Soluble supernatant 3: Inclusion body precipitation

3.2.3 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白的纯化及反应原性鉴定

利用包涵体蛋白纯化试剂盒对重组 pET32a-E0 蛋白进行纯化后，经 SDS-PAGE 鉴定发现，仅在 45KDa 左右存在一单一条带，表明重组 pET32a-E0 蛋白纯化效果良好（图 7）。

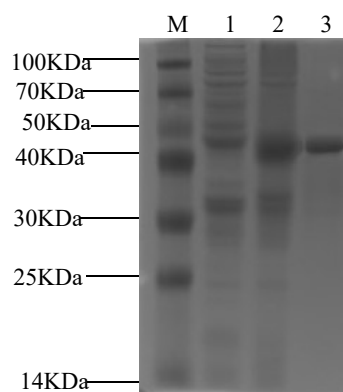


图 7. pET32a-E0 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure.7 SDS-PAGE analysis of pET32a-E0 protein purification

M: 蛋白 Maker 1: pET32a 空载体 2:重组 pET32a-E0 蛋白 3: pET32a-E0 蛋白纯化

M: Protein Maker 1: pET32a empty vector 2: recombinant pET32a-E0 protein 3: pET32a-E0 purified protein

同样的，对纯化的蛋白 pET32a-E2 经 SDS-PAGE 检测可以发现一单一明显的条带在 40KDa 左右，说明 pET32a-E2 蛋白纯化较成功（图 8）

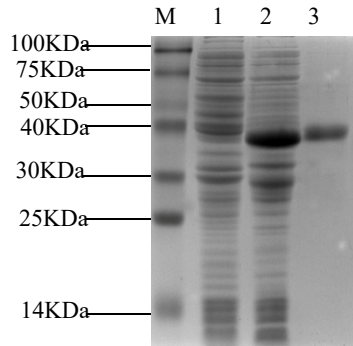


图 8. pET32a-E2 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure.8 SDS-PAGE analysis of pET32a-E2 protein purification

M: 蛋白 Maker 1: pet32a 空载体 2:重组蛋白 pET32a-E2 protein 3: pET32a-E2 蛋白纯化

M: Protein Maker 1: pET32a null vector 2: recombinant pET32a-E2 protein 3: pET32a-E2 purified protein

将纯化后的蛋白 pET32a-E0 进行 Western-blotting 反应经 DAB 显色后，在约 45KDa 处可见一明显条带，表明重组蛋白 pET32a-E0 与 CSFV 阳性血清之间能发生良好的特异性反应(图 11)。同样地，对纯化后的 pET32a-E2 蛋白进行 Western-blotting 试验后发现，约 40KDa 处可看见明显的条带，说明重组蛋白 pET32a-E2 有良好的反应原性。

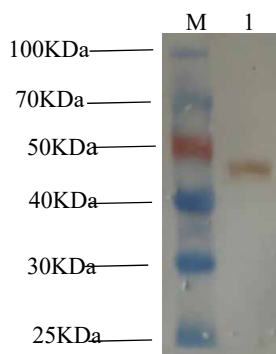


图 9.pET32a-E0 蛋白 Western-blotting 分析

Figure.9 Western-blotting analysis of pET32a-E0 protein

M: 蛋白 Maker 1: pET32a- E0 蛋白

M: protein Maker 1: pET32a-E0 protein

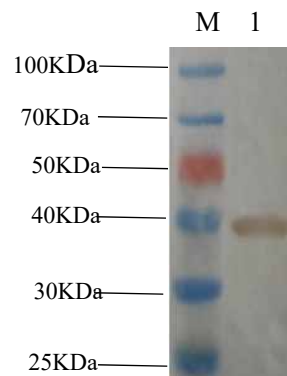


图 10. pET32a-E2 蛋白 Western-blotting 分析

Figure.10 Western-blotting analysis of pET32a-E2 protein

M: 蛋白 Maker 1: pET32a-E2 蛋白

M: protein Maker 1: pET32a-E2 protein

3.3 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 方法建立

3.3.1 重组 pET32a-E0、pET32a-E2 蛋白及阴阳性血清最佳稀释浓度

利用方阵法测定的蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数的结果如表所示（表 3、表 4），对结果分析后确定当选用重组蛋白 pET32a-E0 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 包被，血清稀释度为 1:100 时包被结果最好，此时 P/N 值最大（7.302）且所测得的阳性血清 OD_{450nm} 值接近 1.0；对于重组蛋白 pET32a-E2，当选用血清稀释倍数为 1:80，蛋白包被浓度为 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 效果最佳，P/N 值最大（6.907）且阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近。

表 3 重组蛋白 pET32a-E0 方阵试验

Table 3 Checkerboard titration array test recombinant protein pET32a-E0

血清稀释倍数 Dilution of serum	蛋白包被浓度($\mu\text{g/mL}$) coating concentration of protein						
	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	
	1:25	+	1.281	1.212	1.178	1.122	1.103
	-	0.225	0.209	0.186	0.168	0.157	0.143
	P/N	5.693	5.799	6.333	6.678	7.025	6.370
1:50	+	1.252	1.183	1.14	1.126	1.001	0.877
	-	0.214	0.199	0.176	0.161	0.15	0.131
	P/N	5.85	5.944	6.477	6.993	6.673	6.694
1:100	+	1.216	1.124	1.078	1.037	0.943	0.765
	-	0.203	0.185	0.161	0.142	0.13	0.114
	P/N	5.991	6.075	6.695	7.302	7.253	6.711
1:200	+	1.165	1.113	1.099	0.941	0.775	0.605
	-	0.191	0.173	0.158	0.139	0.123	0.114
	P/N	6.099	6.433	6.955	6.769	6.301	5.307

注：+表示 CSFV 阳性血清 OD_{450nm} 值；-表示 CSFV 阴性血清 OD_{450nm} 值；加粗字体表示最佳反应条件下的阳性值、阴性值和 P/N 值。

表 4 重组蛋白 pET32a-E2 方阵试验

Table 4 Checkerboard titration test of recombinant protein pET32a-E2

血清稀释倍数 Dilution of serum	蛋白包被浓度($\mu\text{g/mL}$) coating concentration of protein						
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	
1:20	+	1.62	1.574	1.49	1.309	1.173	1.044
	-	0.276	0.261	0.248	0.214	0.175	0.162
	P/N	5.869	6.031	6.008	6.116	6.702	6.444
1:40	+	1.27	1.168	1.123	1.115	0.979	0.912
	-	0.264	0.225	0.197	0.175	0.142	0.138
	P/N	4.81	5.191	5.701	6.371	6.894	6.608
1:80	+	1.149	1.105	1.097	1.043	0.833	0.794
	-	0.215	0.184	0.163	0.151	0.127	0.121
	P/N	5.344	6.005	6.730	6.907	6.559	6.561
1:160	+	0.886	0.862	0.78	0.769	0.753	0.642
	-	0.195	0.172	0.167	0.153	0.121	0.106
	P/N	4.543	5.011	4.670	5.026	6.22	6.056

3.3.2 最适封闭液确定

对重组蛋白的最适封闭液确定结果如表 5、表 6, 当重组蛋白 pET32a-E0 选用 5% 胎牛血清为封闭液时效果最好, P/N 值 (7.598) 明显大于其他组且阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值在 1.0 左右; 重组蛋白 pET32a-E2 的最适封闭液为 5% 脱脂牛奶, 此时阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值在 1.0 左右并且 P/N 值 (6.888) 大于其他组。

表 5 重组蛋白 pET32a-E0 间接 ELISA 封闭液的确定

Table 5 Determination of blocking solution of recombinant protein pET32a-E0 indirect ELISA

血清稀释倍数 Serum dilution	封闭液 Blocking solution			
	5%胎牛血清	1%BSA	5%脱脂奶粉	5%新牛血清
(+)	1.079	1.155	1.034	0.942
1:100 (-)	0.142	0.239	0.147	0.154
P/N	7.598	4.832	7.034	6.116

表 6 重组蛋白 pET32a-E2 间接 ELISA 方法封闭液的确

Table 6 Determination of blocking solution of recombinant protein pET32a-E2 indirect ELISA

血清稀释倍数 Serum dilution	封闭液 Blocking solution			
	5%新牛血清	1%BSA	5%脱脂奶粉	5%胎牛血清
(+)	0.946	0.776	1.047	1.234
1:80 (-)	0.142	0.203	0.152	0.219
P/N	6.661	3.822	6.888	5.634

3.3.3 最佳包被时间确定

以不同的包被时间作为变量对两重组蛋白分别进行包被来确定最佳包被时间, 所得结果如表7、表8所示, 当两蛋白均选用37°C恒温孵育2 h, 4°C过夜包被时效果最好, 此时阳性血清的OD_{450nm}值在1.0附近且P/N值最大 (pET32a-E0蛋白P/N值为7.564、pET32a-E2蛋白P/N值为6.628)。

表 7 重组蛋白 pET32a-E0 的最佳包被时间

Table 7 Optimal coating time of recombinant protein pET32a-E0

一抗稀释倍数 Antibody dilution	不同的包被条件			
	4°C过夜	37 °C 2h	37 °C 1h	37 °C 2h, 4°C过夜
(+)	0.645	1.013	1.098	0.991
1:100 (-)	0.205	0.154	0.217	0.131
P/N	3.146	6.577	5.059	7.564

表 8 重组蛋白 pET32a-E2 的最佳包被时间

Table 8 Optimal coating time of recombinant protein pET32a-E2

一抗稀释倍数 Antibody dilution	不同的包被条件			
	37 °C 1h	37 °C 2h	4°C过夜	37 °C 2h, 4°C过夜
(+)	1.009	1.021	0.91	1.16
1:80 (-)	0.21	0.203	0.24	0.175
P/N	4.804	5.029	3.791	6.628

3.3.4 最佳酶标二抗稀释倍数

对设置的几个不同浓度的酶标二抗检测所得结果如表 9 所示, 对结果分析可知, 当 pET32a-E0 重组蛋白选用 20000 倍稀释的酶标抗体时效果最佳, 此时阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近且 P/N 值 (7.19) 明显大于其他组。

表 9 重组蛋白 pET32a-E0 间接 ELISA 方法最佳酶标二抗稀释倍数

Table 9 Optimum dilution of SPA of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E0

一抗稀释倍数 Antibody dilution	IgG-HRP 浓度				
	1:10000	1:2 0000	1:30 000	1:40 000	
1:100	+	1.23	1.021	0.87	0.79
	-	0.176	0.142	0.132	0.126
	P/N	6.988	7.190	6.591	6.269

相同地，对 pET32a-E2 重组蛋白间接 ELISA 方法的酶标二抗最佳稀释倍数的测定结果如表 10 所示，当选用 20000 倍稀释的酶标抗体效果最好，阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近且 P/N 值最大（6.958）。

表 10 重组蛋白 pET32a-E2 间接 ELISA 方法最佳酶标二抗稀释倍数

Table 10 Optimum dilution of SPA of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E2

一抗稀释倍数 Antibody dilution	IgG-HRP 浓度				
	1:10000	1:2 0000	1:30 000	1:40 000	
1:100	+	1.717	0.995	0.781	0.63
	-	0.345	0.143	0.117	0.103
	P/N	4.977	6.958	6.675	6.116

3.3.5 底物最佳显色时间

如表 11 所示，当包被抗原为 pET32a-E0 蛋白时，底物显色液于室温避光处反应 10 min 时效果最佳，此时 P/N 值为 7.187 且阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近。

表 11 pET32a-E0 蛋白间接 ELISA 的底物最佳作用时间

Table 11 Substrate optimal action time of indirect ELISA of pET32a-E0 protein

一抗稀释倍数 Antibody dilution	室温避光显色时间			
	Color development time in the dark at room temperature			
	10min	15 min	20 min	25 min
1:100 (+)	0.999	1.075	1.124	1.203
1:100 (-)	0.139	0.159	0.17	0.196
P/N	7.187	6.761	6.611	6.137

由表 12 可知，当 pET32a-E2 蛋白作为包被抗原时，TMB 显色液于室温暗处反应 15 min 时效果最好，P/N 值较高（7.141）且阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近。

表 12 pET32a-E2 蛋白的底物最佳作用时间

Table 12 Substrate optimal action time of indirect ELISA of pET32a-E0 protein

一抗稀释倍数 Antibody dilution	室温避光显色时间 Color development time in the dark at room temperature			
	10 min	15 min	20 min	25 min
1:80 (+)	0.943	1.114	1.383	1.574
1:80 (-)	0.149	0.156	0.169	0.217
P/N	6.328	7.141	8.183	7.253

3.3.6 阴阳性临界值的确定

使用建立的 pET32a-E0 间接 ELISA 方法对 30 份 CSFV 阴性血清的检测结果显示如表 13 所示, 对所得结果进行计算和分析得到 30 份样品的 OD_{450nm} 的平均值 (X) 为 0.160, 标准差 (SD) 为 0.057。根据统计学原理, 阴性对照标准方差 (SD) × 3 + 阴性对照平均值 (X) 时 = 0.331。因此, 确定 pET32a-E0 间接 ELISA 方法的阴阳性临界值为 0.331。

表 13 重组蛋白 pET32a-E0 间接 ELISA 方法的阴阳性临界值

Table 13 The cut-off value of recombinant protein pET32a-E0 indirect ELISA

序号	OD _{450nm} 值	序号	OD _{450nm} 值	序号	OD _{450nm} 值
1	0.163	11	0.176	21	0.151
2	0.153	12	0.184	22	0.141
3	0.193	13	0.217	23	0.092
4	0.175	14	0.188	24	0.073
5	0.248	15	0.132	25	0.076
6	0.098	16	0.207	26	0.066
7	0.127	17	0.097	27	0.265
8	0.145	18	0.157	28	0.175
9	0.284	19	0.225	29	0.168
10	0.132	20	0.127	30	0.232

如表 14 所示, 对 pET32a-E2 间接 ELISA 方法检测的 30 份 CSFV 阴性血清的结果进行计算和分析, 得到 OD_{450nm} 值的标准差 (SD) 为 0.044, 均值 (X) 为 0.167。根据统计学原理, 阴性对照标准方差 (SD) × 3 + 阴性对照平均值 (X) 时 = 0.299。因此, 该间接 ELISA 方法的临界值为 0.299。

表 14 重组蛋白 pET32a-E2 间接 ELISA 方法的阴阳性临界值

Table 14 The cut-off value of recombinant protein pET32a-E2 indirect ELISA

序号	OD _{450nm} 值	序号	OD _{450nm} 值	序号	OD _{450nm} 值
1	0.234	11	0.198	21	0.206
2	0.142	12	0.085	22	0.164
3	0.129	13	0.205	23	0.104
4	0.178	14	0.202	24	0.136
5	0.233	15	0.169	25	0.151
6	0.088	16	0.199	26	0.175
7	0.193	17	0.173	27	0.142
8	0.223	18	0.121	28	0.208
9	0.152	19	0.225	29	0.187
10	0.179	20	0.096	30	0.216

3.3.7 特异性试验

用两种重组蛋白建立的 ELISA 方法分别对 PCV2、PRV、PEDV、FMDV、PRRSV 阳性血清进行检测并计算出均值.由表 15、表 16 可知,除 CSFV 阳性血清,其他血清样本的 OD_{450nm} 值均小于阴阳性临界值,可判定为阴性。这表明所建立的重组 pET32a-E0 蛋白与 pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 检测方法与其他血清都没有交叉反应。

表 15 重组蛋白 pET32a-E0 间接 ELISA 的交叉反应试验

Table 15 The cross-reaction test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E0.

	FMDV	PRRSV	PEDV	PRV	PCV2	CSFV (-)	CSFV (+)
OD _{450nm} 均值	0.113	0.126	0.168	0.244	0.161	0.147	1.268
结果	-	-	-	-	-	-	+

表 16 重组蛋白 pET32a-E2 间接 ELISA 的交叉反应试验

Table 16 The cross-reaction test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E2

	FMDV	PRRSV	PEDV	PRV	PCV2	CSFV (-)	CSFV (+)
OD _{450nm} 均值	0.133	0.154	0.135	0.254	0.173	0.141	1.138
结果	-	-	-	-	-	-	+

3.3.8 重复性试验

对五份不同的猪血清样品在同一 96 孔反应板上利用重组蛋白 pET32a-E0 建立的间接 ELISA 方法进行试验得到结果,如表 17 所示。对结果分析可知样品的批内重复

试验的变异系数均低于 5%，平均变异系数为 3.716%，表明所建立的重组 pET32a-E0 蛋白间接 ELISA 检测方法有良好的批内重复性。相同地，利用重组蛋白 pET32a-E2 建立的间接 ELISA 对五份不同的临床血清样品检测结果如表 18 所示，样本的批内重复试验的变异系数均不高于 10%，表明建立的重组 pET32a-E2 蛋白间接 ELISA 检测方法具有良好的批内重复性。

表 17 重组蛋白 pET32a-E0 间接 ELISA 的批内重复试验

Table 17 Intra-assay repeated test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E0

样品号	重复孔			标准差 SD	平均值 X	变异系数 CV (%)
	1	2	3			
1	1.055	1.114	1.025	0.037	1.065	3.472
2	1.101	1.141	1.181	0.033	1.141	2.862
3	0.897	0.846	0.913	0.028	0.885	3.227
4	0.104	0.097	0.094	0.004	0.0983	4.261
5	1.029	0.967	0.916	0.046	0.971	4.76

表 18 重组蛋白 pET32a-E2 间接 ELISA 的批内重复试验

Table 18 Intra-assay repeated test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E2

样品号	重复孔			平均值 X	标准差 SD	变异系数 CV (%)
	1	2	3			
1	0.963	0.929	0.997	0.963	0.027	2.883
2	0.811	0.859	0.867	0.846	0.024	2.924
3	1.179	1.119	1.136	1.144	0.025	2.206
4	1.043	1.037	1.125	1.068	0.040	3.757
5	0.199	0.176	0.193	0.189	0.009	5.144

利用两种重组蛋白建立的间接 ELISA 方法分别对五份不同的血清样品在不同的 96 孔板上包被后进行检测，所得到的结果如表 19、表 20 所示。两者的批间变异系数均不超过 10%，表明基于重组 pET32a-E0 蛋白和重组 pET32a-E2 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法批间重复性较好。

表 19 pET32a-E0 重组蛋白间接 ELISA 的批间重复试验

Table 19 Inter-assay repeated test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E0

序号	批次			标准差	平均值	变异系数 CV (%)
	1	2	3			
1	1.121	1.095	1.063	0.023	1.093	2.170
2	1.173	1.111	1.127	0.026	1.137	2.311
3	0.906	0.917	0.849	0.029	0.891	3.346
4	0.092	0.105	0.097	0.005	0.098	5.463
5	1.098	0.997	0.965	0.056	1.02	5.557

表 20 pET32a-E2 重组蛋白间接 ELISA 的批间重复试验

Table 20 Inter-assay repeated test of indirect ELISA of recombinant protein pET32a-E2

序号	批次			标准差	平均值	变异系数 CV (%)
	1	2	3			
1	0.918	0.893	1.009	0.061	0.061	6.494
2	0.846	0.901	0.877	0.022	0.022	2.574
3	1.175	1.195	1.145	0.025	0.025	2.148
4	1.021	1.087	1.048	0.033	0.033	3.154
5	0.196	0.164	0.189	0.014	0.014	7.505

3.3.9 临床样品的检测

如表 21 所示,用建立的 ELISA 方法对河北省不同地区的 121 份注射弱毒疫苗的猪血清和来源于仅注射 E2 亚单位疫苗的 158 份猪血清进行检测,对结果进行统计分析。对 121 份注射弱毒疫苗的猪血清的检测结果显示,爱德士猪瘟抗体 ELISA 检测试剂盒检测出的抗体阳性为 105 份,阴性为 16 份;E0 蛋白检测总符合率为 85.95% (104/121);E2 蛋白检测总符合率为 87.6% (106/121)。这表明本实验所建立的间接 ELISA 方法与爱德士猪瘟检测试剂盒有较好的一致性并且具有一定的实际应用价值。

表 21 与 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒符合率分析

Table 19 coincidence to IDEXX kit

IDEXX 猪瘟 ELISA 试剂盒 检测结果	间接 ELISA 检测结果	
	E0 蛋白检测总符合率	E2 蛋白检测总符合率
阳性 105 份	85.95%	87.6%
阴性 16 份		

对于 158 份注射 E2 亚单位疫苗的检测结果显示， E2 蛋白检测抗体阳性为 144 份，阴性为 14 份，阳性率为 91.13%； E0 蛋白检测抗体阳性为 25 份，阴性 133 份，阳性率为 15.82%。这初步可以表明注射 E2 亚单位疫苗后能为猪群提供相对较高的保护率，但有部分野毒抗体的产生。

4 讨论

4.1 CSFV E2 和 E0 基因的克隆及原核表达

猪瘟疫病毒(CSFV)属黄病毒科瘟病毒属成员,与同属的牛病毒性腹泻和羊边界病毒存在交叉反应。猪瘟于1833年首次发现于美国的俄亥俄州,后其他国家开始陆续报道疫情,我国各个省市也相继有猪瘟的发生。虽然欧盟的国家在控制猪瘟的流行方面取得了一定的成功,但CSFV的感染仍然对包括中国在内的发展中国家的生猪养殖业带来了巨大的冲击。猪瘟作为一种烈性接触性传染病,主要引起机体的败血性疾病,还会导致母猪的繁殖障碍性疾病。由于注射传统的猪瘟弱毒疫苗后不能将疫苗抗体和自然感染产生的抗体区分开来,各种新型标记疫苗的开发已经成为了未来净化 and 根除猪瘟的趋势。E2亚单位疫苗是目前唯一商品化的标记疫苗,这需配合相应的血清学检测以达到诊断的目的^[112]。因此,建立针对CSFV的快速诊断方法,对于CSFV的净化具有重要作用。

在CSFV的蛋白中,E0、E2、NS3蛋白可以引起机体产生抗体,然而针对NS2.3的抗体不能用于血清学分化,因为用其他瘟病毒感染的猪产生的NS2.3抗体会与针对CSFV的抗体发生交叉反应,相当比例的猪具有牛病毒腹泻病毒或边界病病毒的抗体^[1]。本实验在E2亚单位疫苗的基础上,以E0和E2蛋白为研究对象,对CSFV进行研究,建立一种与E2亚单位疫苗配套使用的间接ELISA方法。

本实验利用DNASar软件对GenBank登录的CSFV E0和E2基因的序列以及抗原优势表位进行分析,设计合成了两对特异性表达引物,分别进行了两基因的扩增、连接转化及蛋白的诱导表达。

本实验选用的表达系统是常用的pET-32a表达系统,将目的基因与PET-32a线性载体连接后转入BL21(DE3)感受态细胞中进行表达。原核表达系统具有操作简单,用时短,表达量高和易纯化等优点,本实验所用的pET-32a载体带有的T7启动子能促进外源目的基因的高效表达,为建立ELISA方法奠定基础。本研究利用pET-32a的His标签,成功纯化出了高质量的目的蛋白,为后续的试验提供了丰富的抗原蛋白。

试验通过在37℃对不同诱导时间下的蛋白进行检测,确定在6h时诱导表达量可达到最大。可溶性试验表明两种重组蛋白均大量存在于包涵体中,因此利用康为世纪的包涵体-His标签蛋白纯化试剂盒对pET32a-E0和pET32a-E2蛋白进行纯化。在溶解包涵体之前,采用含有尿素的Tri-HCl洗去包涵体表面的杂蛋白,以利于提高蛋白纯化的效果。WB试验则说明重组蛋白的反应原性良好,能够与CSFV的阳性血清发生特异性反应。

4.2 重组pET32a-E0和pET32a-E2蛋白间接ELISA检测方法的建立

在猪瘟的监测计划中,最常用的就是血清学抗体监测方法,其中酶联免疫吸附实验又是最重要的。该试验的原理是利用抗原抗体特异性结合的原理,具有特异性强、

灵敏度高、操作简单的特点。目前国内已经开始推广使用 E2 亚单位疫苗以进行猪瘟的净化, 但还缺少与其配合使用的 ELISA 检测试剂盒。在本研究中, 利用 CSFV 的 E0 和 E2 蛋白的优势抗原表位进行猪瘟野毒和疫苗抗体检测 ELISA 方法的建立, 研究表明, E0 和 E2 蛋白是猪瘟的主要免疫性抗原, 这就使得本研究建立的检测方法更具准确性。

本实验利用方阵法来确定蛋白包被浓度和血清稀释倍数, 随后经过对各项条件进行优化。将抗原蛋白与碳酸盐缓冲液混合固定在 96 孔 ELISA 包被板上, 置适当条件下进行孵育, 使得蛋白能与 ELISA 板的充分结合。

抗原包被时所用浓度较低, 封闭就是让无关蛋白填充抗原吸附后固相载体表面未被占据的空隙, 从而排斥后续的干扰。常用的封闭液有 5% 的胎牛血清, 5% 的新牛血清, 1% BSA, 5% 脱脂牛奶等, 本实验同时运用上述几种封闭液, 确定 pET32a-E0 蛋白的最适封闭液是 5% 的胎牛血清, pET32a-E2 蛋白的最适封闭液是 5% 脱脂牛奶。

本实验采用的是 HRP 标记的兔抗猪 IgG 作为二抗。在合适的抗原和血清稀释度下, 设置二抗稀释度梯度, 最后确定 pET32a-E0 和 pET32a-E2 蛋白的二抗稀释倍数均为 1: 20000。

TMB 是一种新型安全的色原试剂, 作为底物与 HRP 作用后显蓝色。且 TMB 安全对人体无致癌性, 对光照条件的要求不高, 因而在 ELISA 试剂盒中应用逐渐广泛。在本实验建立的 ELISA 方法中, pET32a-E0 蛋白的 TMB 最佳反应时间为 10 min, pET32a-E2 蛋白的 TMB 最佳反应时间为 15 min。

在对重组蛋白 pET32a-E0 和 pET32a-E2 蛋白建立的间接 ELISA 方法进行重复性试验的结果显示, 批内和批间重复性的变异系数均低于 10%。特异性试验结果显示, 所建立的 ELISA 方法与 PEDV、PRRSV、PRV、FMDV、PCV2 的阳性血清均无交叉反应。检测结果表明建立的 ELISA 方法具有良好的重复性和特异性。

用建立的 ELISA 方法对河北省不同地区的 121 份注射弱毒疫苗的血清样品进行检测, 经过与爱德仕猪瘟阻断 ELISA 检测试剂盒进行对比发现, E2 蛋白总符合率为 87.6%, E0 蛋白总符合率为 85.95%, 表明本实验建立的 ELISA 方法有一定的实用性但出现了的假阳性结果, 需要我们在以后的研究中对抗原的纯化方法和各个反应条件进行进一步的优化。而对于来源于仅注射 E2 亚单位疫苗猪场的 158 份猪血清检测结果显示, E2 蛋白检测抗体阳性率为 91.13%, E0 蛋白检测抗体阳性率为 15.82%, 这可以初步表明 E2 亚单位疫苗的免疫效果较好, 但依然产生了野毒抗体, 可能是各种原因导致的免疫失败现象发生。该试验所建立的猪瘟间接 ELISA 检测方法, 可在一定程度上检测猪瘟野毒, 为 E2 亚单位疫苗的推广和应用提供了配套的检测方法, 也为进一步开发猪瘟 ELISA 诊断试剂盒奠定了基础。

5 结论

5.1 通过分子克隆技术成功构建 pET32a-E0 、pET32a-E2 表达载体并成功进行了目的蛋白的诱导表达。

5.2 可溶性试验表明重组蛋白大量存在于包涵体当中，利用包涵体-His 标签试剂盒纯化出了纯度相对较高的蛋白。

5.3 初步建立了基于猪瘟病毒 E0、E2 蛋白的间接 ELISA 检测方法。

参考文献

- [1] 阎志峰. 猪瘟流行特点及防控建议[J]. 畜牧兽医科技信息, 2017, 2: 81-82.
- [2] Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge[J]. *Veterinary Journal*, 2003, 165(1): 11-20.
- [3] J Fritze-meier, J Teuffert, I Greiser-Wilke, *et al.* Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 77: 29-41.
- [4] Choi C, Chae C. Detection of classical swine fever virus in boar semen by reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 2003, 15(1): 35-41.
- [5] Laevens H, Koenen F, Deluyker H, *et al.* Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: transmission of the virus, course of the disease and antibody response[J]. *The Veterinary Record*, 1999, 145(9): 243-248.
- [6] Schulz K, Staubach C, Blome S. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 84.
- [7] 张志, 李晓成. 我国猪瘟流行现状和防控建议[J]. *中国动物检疫*, 2015, (8): 8-12.
- [8] 苏景. 猪瘟的流行病学、临床症状、诊断及防控措施[J]. *现代畜牧科技*, 2016, (12): 117.
- [9] Blome S, Staubach C, Henke J, *et al.* Classical Swine Fever-An Updated Review[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 86.
- [10] Chander V, Nandi S, Ravishankar C, *et al.* Classical swine fever in pigs: recent developments and future perspectives[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2014, 15(1): 87-101.
- [11] Kaden V, Steyer H, Schnabel J, *et al.* Classical swine fever (CSF) in wild boar: the role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF[J]. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 2005, 52(4): 161-164.
- [12] Julia Henke, Jolene Carlsona, LauraZani, *et al.* Protection against transplacental transmission of moderately virulent classical swine fever virus using live marker vaccine "CP7_E2alf"[J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4181-4187.
- [13] Ning Pengbo, Wu Zhongxing, Li Xuepeng, *et al.* Development of functionalized gold nanoparticles as nanoflare probes for rapid detection of classical swine fever virus[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2018, 171:110-114.
- [14] Elbers K, Tautz N, Becher P, *et al.* Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(6): 4131-4135.
- [15] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, *et al.* Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses[J]. *Journal of Virology*, 1993, 67(6): 3288-3294.
- [16] Smith T K, Meister A. Active deglycosylated mammalian gamma-glutamyl transpeptidase[J]. *the FASEB Journal*, 1994, 8(9): 661-664.
- [17] Wiskerchen M, Collett M S. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing[J]. *Virology*, 1991, 184(1): 341-350.

- [18] Chen Shucheng, Li Su, Sun Huimin, *et al.* Expression and characterization of a recombinant porcized antibody against the E2 protein of classical swine fever virus[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2018, 102(2): 961-970.
- [19] Sun Yuan, Tian Da Yong, Li Su, *et al.* Comprehensive evaluation of the adenovirus/alphavirus-replicon chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever[J]. Vaccine, 2013, 31(3): 538-544.
- [20] König M, Lengsfeld T, Pauly T, *et al.* Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins[J]. Journal Virology, 1995, 69(10): 6479-6486.
- [21] de Smit AJ. Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review[J]. Veterinary Quarterly, 2000, 22(4): 182-188.
- [22] Gladue D P, O'Donnell V, Fernandez-Sainz I J, *et al.* Interaction of structural core protein of classical swine fever virus with endoplasmic reticulum-associated degradation pathway protein OS9[J]. Virology, 2014, 460-461: 173-179.
- [23] Dong Xiao Nan, Chen Ying Hua. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. Vaccine, 2007, 25(2): 205-230.
- [24] Weiland E, Stark R, Haas B, *et al.* Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer[J]. Journal Virology, 1990, 64(8): 3563-3569.
- [25] Cao Tong, Wang Zuohuan, Li Xiaoye, *et al.* E2 and E(rns) of classical swine fever virus C-strain play central roles in its adaptation to rabbits[J]. Virus Genes, 2019, 55(2):238-242.
- [26] Weiland F, Weiland E, Unger G, *et al.* Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles[J]. The Journal of General Virology, 1999, 80 (5):1157-1165.
- [27] Van Gennip H G, Vlot A C, Hulst M M, *et al.* Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia[J]. Journal Virology, 2004, 78(16): 8812-8823.
- [28] Weiland E, Ahl R, Stark R, *et al.* A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus[J]. Journal Virology, 1992, 66(6): 3677-3682.
- [29] Schneider R, Unger G, Stark R, *et al.* Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease[J]. Science, 1993, 261(5125): 1169-1171.
- [30] Fernandez-Sainz I, Holinka L G, Gavrillov B K, *et al.* Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine[J]. Virology, 2009, 386(1): 210-216.
- [31] Windisch, J. M, Schneider, R, Stark, R, *et al.* RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies[J]. Journal Virology, 1996, 70(1): 352-358.
- [32] Lin Min, Trottier Erottier, Pasick John, *et al.* Identification of antigenic regions of the Erns protein for pig antibodies elicited during classical swine fever virus infection[J]. Journal of Biochemistry, 2004, 136(6): 795-804.
- [33] Langedijk J P, van Veelen P A, Schaaper W M, *et al.* A structural model of pestivirus E(rns) based

- on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide[J]. *Journal Virology*, 2002, 76(20): 10383-10392.
- [34] Lv H, Dong W, Qian G, *et al.* US10, a novel Npro-interacting protein, inhibits classical swine fever virus replication[J]. *The Journal of General Virology*, 2017, 98(7): 1679-1692.
- [35] Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, *et al.* The Npro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation[J]. *Journal Virology*, 2006, 80(23): 11723-11732.
- [36] Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, *et al.* Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation[J]. *Journal Virology*, 2007, 81(7): 3087-3096.
- [37] Tamura T, Nagashima N, Ruggli N, *et al.* Npro of classical swine fever virus contributes to pathogenicity in pigs by preventing type I interferon induction at local replication sites[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45:47.
- [38] Gong YH, Trowbridge R, Macnaughton T B, *et al.* Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus[J]. *the Journal of General Virology*, 1996, 77 (11):2729-2736.
- [39] Kang-kang Guo, Qing-hai Tang, Yan-ming Zhang, *et al.* Identification of two internal signal peptide sequences: critical for classical swine fever virus non-structural protein 2 to trans-localize to the endoplasmic reticulum[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 236.
- [40] Xu J, Mendez E, Caron P R, *et al.* Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication[J]. *Journal Virology*, 1997, 71(7): 5312-5322.
- [41] Walker J E, Saraste M, Runswick M J, *et al.* Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold[J]. *the EMBO Journal*, 1982, 1(8): 945-951.
- [42] Gorbalenya A E, Koonin E V. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(21): 8413-8440.
- [43] Wen Guoyuan, Xue Jinnuo, Shen Yanping, *et al.* Characterization of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity and its modulation by CSFV RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Virus Research*, 2009, 141(1): 63-70.
- [44] Wen G, Chen C, Luo X, *et al.* Identification and characterization of the NTPase activity of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 3 (NS3) expressed in bacteria[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(8): 1565-1573.
- [45] He Lei, Zhang Yan Ming, Lin Zhi, *et al.* Classical swine fever virus NS5A protein localizes to endoplasmic reticulum and induces oxidative stress in vascular endothelial cells[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(2): 274-282.
- [46] Chengcheng Z, Lei H, Kai K, *et al.* Screening of cellular proteins that interact with the classical swine fever virus non-structural protein 5A by yeast two-hybrid analysis[J]. *Journal of Biosciences*,

- 2014, 39(1): 63-74.
- [47] Chun S, Xiaoxiang L, Qiuyue J, *et al.* Annexin A2 is involved in the production of classical swine fever virus infectious particles[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(5): 1027-1032.
- [48] Dong Xiaoying, Tang Sheng Qiu. Classical swine fever virus NS5A protein changed inflammatory cytokine secretion in porcine alveolar macrophages by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway[J]. *Virology Journal*, 2016, 13:101.
- [49] Li Helin, Zhang Chengcheng, Cui Hongjie, *et al.* FKBP8 interact with classical swine fever virus NS5A protein and promote virus RNA replication[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(1): 1-8.
- [50] Chun S, Shumeng K, Qiuyue J, *et al.* Characterization of the C-terminal sequence of NS5A necessary for the assembly and production of classical swine fever virus infectious particles[J]. *Research in Veterinary Science*, 2014, 97(2): 449-454.
- [51] Postel A, Austermann-Busch S, Petrov A, *et al.* Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 1(12): 248-261.
- [52] Calderaro A, Arcangeletti M C, Rodighiero I, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6803.
- [53] Seo S, Sunwoo S, Hyun B, *et al.* Detection of antibodies against classical swine fever virus in fecal samples from wild boar[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 161(1-2): 218-221.
- [54] Li Xuewu, Wang Li, Shi Xibao, *et al.* Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus[J]. *Journal of Virology Methods*, 2012, 180(1-2): 32-37.
- [55] Jiang Y, Shang H, Xu H, *et al.* Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction[J]. *the Veterinary Journal*, 2010, 183(2): 172-175.
- [56] Ning P, Li H, Liang W, *et al.* Detection and differentiation of classical swine fever virus strains C and Shimen by high-resolution melt analysis[J]. *Journal of Virology Methods*, 2013, 194(1-2): 129-131.
- [57] Liu Shih-Tung , Li Shui Nin, Wang Ding Cheng, *et al.* Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction[J]. *Journal of Virology Methods*, 1991, 35(2): 227.
- [58] 刘梅芬, 王淑娟, 闫若潜, 等. 猪瘟病毒巢式 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(9): 2285-2290.
- [59] 谭飞, 马士博, 王瑞翀, 等. 猪瘟病毒和猪流行性腹泻病毒双重 RT-PCR 方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(10): 28-30.
- [60] 陈静, 张小飞, 范红结, 等. 猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 RT-PCR 方法的建立和初步应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 94-97.
- [61] Zhao Yarong, Liu Shanshan, Hu Quanbo, *et al.* A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus, and porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus in clinical specimens[J]. *Journal of Virology Methods*, 2011, 172(1): 88-92.
- [62] Vilček Š, Herring A J, Herring J A, *et al.* Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis[J]. *Archives Virology*, 1994, 136(3-4): 309-323.
- [63] Sandvik T, Paton D J, Lowings P J. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions[J]. *Journal of Virology Methods*, 1997, 64(1): 43.
- [64] Hyndman L, Vilcek S, Conner J, *et al.* A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses[J]. *Journal of Virology Methods*, 1998, 71(1): 69-76.
- [65] Paton D J, Mcgoldrick A, Bensaude E, *et al.* Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods[J]. *Veterinary Microbiol*, 2000, 73(2): 159-174.
- [66] Hoffmann B, Blome S, Bonilauri P, *et al.* Classical swine fever virus detection: results of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction ring trial conducted in the framework of the European network of excellence for epizootic disease diagnosis and control[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc*, 2011, 23(5): 999-1004.
- [67] Le-Dimna M, Vrancken R, F, Bougeard S, *et al.* Validation of two commercial real-time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus[J]. *Journal of Virology Methods*, 2008, 147(1): 136-142.
- [68] 王淑娟, 刘梅芬, 闫若潜, 等. 猪瘟疫病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(7): 2112-2118.
- [69] 高飞, 姜一峰, 李国新. 针对猪瘟疫病毒 E2 蛋白的实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(05): 27-32.
- [70] Li Xuewu, Wang Li, Shi Xibao, *et al.* Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus[J]. *Journal of Virology Methods*, 2012, 180(1-2): 32-37.
- [71] 张露. 猪瘟疫病毒 E0 蛋白单克隆抗体的制备及其胶体金免疫层析检测方法的初步探索[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [72] Jeroen Dewulf, Frank Koenen, Koen Mintiens, *et al.* Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection, *et al.* Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection[J]. *Journal of Virology Methods*, 2004, 119(2): 137-143.
- [73] 汤赛冬, 周雪芳, 周光胜, 等. 检测猪瘟疫抗原的夹心 ELISA 诊断试剂盒的制备、标化和应用的研究[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2002, (02): 14-15.
- [74] 李文良, 毛立, 江杰元, 等. 猪瘟疫病毒 E2 蛋白主要抗原区的原核表达及其间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(5): 8-13.

- [75] 吴素丽, 孙惠玲, 钱永华. 猪瘟病毒 E0 蛋白的高效表达及其间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2009, 30(8): 13-18.
- [76] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63.
- [77] Chowdry V K, Luo Y, Widén F, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field[J]. Journal of Virology Methods, 2014, 197(3): 14-18.
- [78] Chen Lei, Fan Xue Zheng, Wang Qin, *et al.* A Novel RT-LAMP Assay for Rapid and Simple Detection of Classical Swine Fever Virus[J]. Virologica Sinica, 2010, 25(1): 59-64.
- [79] Postel A, Pérez LJ, Perera CL, *et al.* Development of a new LAMP assay for the detection of CSFV strains from Cuba: a proof-of-concept study[J]. Archives of Virology, 2015, 160(6): 1435-1448.
- [80] 曲光刚, 杨慧, 唐娜, 等. 猪瘟病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立和应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, (15): 121-123.
- [81] 赵明秋, 王伟芳, 王波, 等. 猪瘟病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(2): 26-28.
- [82] Greiser-Wilke I, Moennig V. Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies[J]. Animal Health Research Reviews, 2004, 5(2): 223-226.
- [83] 韩雪清, 刘湘涛. 猪瘟病毒及其猪瘟疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2000, (2): 1-7.
- [84] Oirschot J T V. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field[J]. Veterinary Microbiol, 2003, 96(4): 367-384.
- [85] A Van Nes, M.C.M De Jong, E.J Schoevers, *et al.* Pseudorabies virus is transmitted among vaccinated conventional pigs, but not among vaccinated SPF pigs[J]. Veterinary Microbiol, 2001, 80(4): 303-312.
- [86] Blome S, Moß C, Reimann I, *et al.* Classical swine fever vaccines—State-of-the-art[J]. Veterinary Microbiol, 2017, 206: 10-20.
- [87] 任鹏举, 李鹏, 张秋雨, 等. 新型猪瘟疫苗的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(7): 1958-1964.
- [88] Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy[J]. Veterinary Microbiol, 2000, 73(2): 93-102.
- [89] Hulst M M, Westra D F, Wensvoort G, *et al.* Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera[J]. Journal of Virology, 1993, 67(9): 5435.
- [90] Moormann RJ, Bouma A, Kramps JA, *et al.* Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test[J]. Veterinary Microbiol, 2000, 73(2-3): 209-219.
- [91] Xiao-Nan D, Ying-Hua C. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. Vaccine, 2007, 25(2): 205-230.
- [92] Guang-Jan Lin, Ming-Chung Deng, Zeng-Weng Chen, *et al.* Yeast expressed classical swine fever E2 subunit vaccine candidate provides complete protection against lethal challenge infection and prevents horizontal virus transmission [J]. Vaccine, 2012, 30(13):2336-2341.

- [93] Depner KR, Bouma A, Koenen F, *et al.* Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows[J]. *Veterinary Microbiol*, 2001, 83(2): 107-120.
- [94] de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, *et al.* Prevention of transplacental transmission of moderate-virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine[J]. *Veterinary Quarterly*, 2000, 22(3): 150-153.
- [95] Lipowski A, Drexler C, Pejsak Z. Safety and efficacy of a classical swine fever subunit vaccine in pregnant sows and their offspring[J]. *Veterinary Microbiol*, 2000, 77(1-2): 99-108.
- [96] Wenliang L, Li M, Bin Z, *et al.* The swine CD81 enhances E2-based DNA vaccination against classical swine fever[J]. *Vaccine*, 2015, 33(30): 3542-3548.
- [97] 周鹏程, 陆宇, 陈建国, 等. 猪瘟疫病毒 E2(gp55)基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究[J]. *微生物学报*, 2000, 40(3): 243-251.
- [98] Sun Yuan, Li Hong Yu, Tian Da Yong, *et al.* A novel alphavirus replicon-vectored vaccine delivered by adenovirus induces sterile immunity against classical swine fever[J]. *Vaccine*, 2011, 29(46): 8364-8372.
- [99] Dong Xiao Nan, Chen Ying Hua. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. *Vaccine*, 2007, 25(2): 205-230.
- [100] Xiao-Nan Dong, Yu Chen, Yi Wu, *et al.* Candidate multi-peptide-vaccine against classical swine fever virus induced potent immunity with serological marker[J]. *Vaccine*, 2005, 23(28): 3630-3633.
- [101] Ganges L, Núñez JI, Sobrino F, *et al.* Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection[J]. *Veterinary Journal*, 2008, 177(2): 169-177.
- [102] Xiao-Nan Dong, Ying-Hua Chen. Candidate peptide-vaccines induced immunity against CSFV and identified sequential neutralizing determinants in antigenic domain A of glycoprotein E2[J]. *Vaccine*, 2006, 24(11): 1906-1913.
- [103] Dong Xiaonan, Chen Yinghua. Spying the neutralizing epitopes on E2 N-terminal by candidate epitope-vaccines against classical swine fever virus[J]. *Vaccine*, 2006, 24(19): 4029-4034.
- [104] Dong Xiaonan, Qi Yun, Ying Jian, *et al.* Candidate peptide-vaccine induced potent protection against CSFV and identified a principal sequential neutralizing determinant on E2[J]. *Vaccine*, 2006, 24(4): 426-434.
- [105] Lin M, Lin F, Mallory M, *et al.* 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]. *Journal of Virology*, 2000, 74(24): 11619-11625.
- [106] Joan T, Marta M, Marta M O, *et al.* Partial protection against classical swine fever virus elicited by dendrimeric vaccine-candidate peptides in domestic pigs[J]. *Vaccine*, 2011, 29(26): 4422-4429.
- [107] Hong Tian, Xiangming Hou, Jinyan Wu, *et al.* A promising multiple-epitope recombinant vaccine against classical swine fever virus[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 157(1-2): 59-64.

- [108] Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, *et al.* Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever[J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78 (12): 3311-3315.
- [109] Rüménapf T, Stark R, Meyers G, *et al.* Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity[J]. *Journal of Virology*, 1991, 65(2): 589-597.
- [110] Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, *et al.* A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001, 80(2): 101-119.
- [111] Dahle J, Liess B, Frey H R. Neutralizing antibody development following sequential inoculation of pigs with strains of bovine viral diarrhea virus and hog cholera virus[J]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin.reihe B. Journal of Veterinary Medicine*, 2010, 34(1-10): 729-739.
- [112] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, *et al.* Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis ® Pesti in pregnant sows [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 77(1): 83-97.
- [113] Floegel-Niesmann G . Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001, 83(2): 121-136.
- [114] Velazquez-Salinas L, Risatti G R, Holinka L G, *et al.* Recoding structural glycoprotein E2 in classical swine fever virus (CSFV) produces complete virus attenuation in swine and protects infected animals against disease[J]. *Virology*, 2016, 494: 178-189.
- [115] 刘宝京. 猪丁型冠状病毒 HB-BD 株分离鉴定及生物学特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2018.
- [116] 牛山. 小干扰 RNA 抑制猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞内的复制[D]. 保定: 河北农业大学, 2018.
- [117] 祁艳华. 猎圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测方法的建立及 PCV2 单克隆抗体的制备[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.

附录

附录 A 琼脂糖凝胶/PCR 产物纯化简明步骤

琼脂糖凝胶/PCR 产物纯化简明步骤 (DC3511/DC3514)

(详细内容请参考说明书英文部分)

实验前准备:

- 第一次使用本产品, 请按照瓶子上的标签或者以下标准加入无水乙醇到 DNA Wash Buffer 中。
DC3511/DC3514-00: 加入 8 mL 无水乙醇到 DNA Wash Buffer 中。
DC3511/DC3514-01: 加入 60 mL 无水乙醇到 DNA Wash Buffer 中。
DC3511/DC3514-02: 每瓶 DNA Wash Buffer 中加入 96 mL 无水乙醇。
DC3511/DC3514-03: 每瓶 DNA Wash Buffer 中加入 60 mL 无水乙醇。
- 100 mg 的凝胶只需要 100 μ L Buffer GC。
- Buffer GC 在低温运输或者保存过程中可能会生成沉淀, 如果有沉淀生成, 请在 37 $^{\circ}$ C 溶解再使用。
- 洗脱前, 在 55-60 $^{\circ}$ C 水浴预热 Elution Buffer。

操作步骤

请使用新鲜配制的 TAE 或者 TBE 缓冲液, 使用多次的缓冲液 pH 会偏高从而影响 DNA 回收效率或带来污染。

1. **琼脂糖凝胶产物纯化:** 从凝胶上割下带有目的片段的凝胶块到一个 1.5 mL 或者 2.0 mL 离心管中, 加入 **1倍体积**的 Buffer GC (称量或者估算凝胶的重量, 确保加入不少于 1倍体积的 Buffer GC), 置于 55-60 $^{\circ}$ C 水浴中 8-10 分钟左右, 期间颠倒混匀几次, 直至凝胶块完全溶化。冷却离心管至室温。

PCR 产物纯化: 加入 **2倍体积**的 Buffer GC (如 100 的 PCR 反应液, 加入 200 μ L Buffer GC), 混合混匀。瞬时离心, 将溶液收集到底部。纯化小于 200 bp 的片段, 加入 5倍体积的 Buffer GC 到 1倍体积的 PCR 反应液。

注意: 100mg 凝胶块需加入 100 μ L 的 Buffer GC, 确保加入不少于 1倍体积的 Buffer GC。

注意: 纯化小于 200 bp 的片段, 加入 1倍体积的异丙醇 (100mg 凝胶块或 100 μ L PCR 反应液, 加入 100 μ L 的异丙醇)。

2. 转移以上混合液 (每次不超过 700 μ L) 至一个带有收集管的吸附柱中, 室温下, 13,000 \times g 下离心 1 分钟, 弃废液, 将离心柱放回收集管中。重复步骤 “2”, 直至剩余的混合液全部通过吸附柱。

3. 加入**600 μL DNA Wash Buffer**至吸附柱中，室温下在13,000 x g下离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回到收集管中。重复步骤3。
注意：DNA Wash Buffer作为浓缩液提供，使用前确保加入无水乙醇。
4. 室温下，13,000 x g，将吸附柱开盖离心2分钟，去除残留的乙醇。
注意：开盖离心更有利于乙醇的去除，乙醇的残留将影响下游实验，可以适当延长离心时间，并且离心后开盖空气中放置几分钟。
5. 转移吸附柱至1.5mL收集管中，加入**30-50 μL 60°C 预热的Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH8.5) 或ddH₂O到吸附柱膜中央**，室温放置1分钟。13,000 x g离心1分钟以洗脱DNA。如果想提高收获量，将洗脱液加回到吸附柱中重新洗脱一次。
注意：将洗脱液置于60 °C预热，加入洗脱液后吸附柱置于60°C放置5分钟后再进行洗脱，将会显著提高DNA回收率。
注意：对大于8kb的片段，加入洗脱液后将吸附柱置于60°C放置15分钟后再进行洗脱，将会显著提高DNA回收率。
注意：第一次洗脱会收集到约60-70%的DNA，将洗脱液加回到柱子中进行二次洗脱，将会收集到另外20%的DNA，DNA回收率可以达到90%以上。DNA回收率会片段大小不同而有差异。

附录 B 质粒小提试剂盒I简明步骤



Biomiga EZgene™ Plasmid Miniprep Kit

质粒小提试剂盒I简明步骤 (PD1211)

(详细内容请参考说明书英文部分)



实验前准备

RNase A: 室温下可稳定贮藏半年, 长期贮藏请置于4℃保存。使用前将提供的所有RNase A瞬时离心后加入Buffer A1, 使用后将Buffer A1/RNase A置于4℃保存。

DNA Wash Buffer: 使用前请将8 mL (PD1211-00)或48 mL (PD1211-01)或88 mL (PD1211-02) 或 216 mL (PD1211-03) 96-100% 乙醇加入DNA Wash Buffer。

Buffer B1: 在低于室温时会沉淀, 请于50℃左右水浴加热至沉淀完全溶解, 溶液澄清, 使用后保证Buffer B1瓶盖旋紧。

Buffer N1: 提前预冷或加入到裂解液后在冰上放置1分钟利于减少蛋白漂浮。

在室温下 (22-25℃) 进行所有离心操作。



注意事项

质粒拷贝数: 纯化中低拷贝的质粒时, 使用2倍的菌液体积, 2倍的Buffer A1,B1,N1, 相同体积的Wash Buffer和Elution Buffer。

转化菌: 若为-70℃甘油冻存的菌, 请先涂布平板培养后, 再重新挑选新的单个菌落进行培养。

切勿直接取冻存的菌种进行培养。



操作步骤

1. 接种新鲜的单个菌落到**1-4 mL**的LB培养基 (含适量抗生素), 37℃震荡培养14-16小时。室温下10,000rpm离心1分钟, 收集菌体, 并尽可能的吸去上清。

注意: 残留的液体培养基容易导致菌液裂解不充分, 第5步离心后沉淀较松, 不能有效吸取上清。

注意: 本说明书中的操作程序适用于标准LB (Luria Bertani) 培养基培养12-16小时后, OD₆₀₀ (细菌密度) 在2.0-3.0之间的菌液。若采用的是富集培养基, 例如TB 或2×YT, 请注意保证OD₆₀₀不超过3.0。

2. 加入**250 μL Buffer A1** (确保已加入RNase A), 用移液枪或涡流震荡充分悬浮细菌细胞。

注意: 细菌细胞如果没有充分悬浮均匀, 将导致菌体裂解不完全, 从而降低产量。



Biomiga EZgene™ Plasmid Miniprep Kit

3. 加入 **250 μL Buffer B1**, 轻轻地反转10次以混合均匀, 然后静置5分钟至溶液粘稠而澄清。
注意: 切勿剧烈振荡。静置时间不超过5分钟, 时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受到损伤。若溶液未清亮澄清, 则表明菌体裂解不充分, 应加大Buffer B1的用量或减少菌体量。
4. 加入**350 μL Buffer N1**, 立即反转多次, 至溶液充分混匀, 此时出现白色絮状沉淀。
注意: 使用前将Buffer N1预冷或在加入到裂解液后在冰上放置1分钟利于减少蛋白漂浮。
5. 将离心管转至高速离心机, 在**室温下**13,000 rpm离心10分钟(若上清中有白色沉淀, 可再次离心)。
6. 小心吸取离心后的上清液至带有收集管的DNA柱中(避免吸起沉淀), 室温下13,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将离心柱重新放回收集管中。
7. 向DNA柱中加入 **500 μL Buffer KB**, 室温下13,000 rpm 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将离心柱重新放回收集管中。
注意: 为了获得高质量的质粒DNA, 我们推荐使用Buffer KB, 尤其是对*endA+*菌株, 以确保去除蛋白残留污染。
8. 向离心柱中加入**500 μL DNA Wash Buffer**(确保已加入**无水乙醇**), 室温下, 13,000 rpm 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将离心柱重新放回收集管中。重复步骤“8”。
9. 将离心柱放回高速离心机中, 13,000 rpm室温下开盖离心5-10分钟, 以彻底去除残留的乙醇。
注意: 此步骤中开盖离心将会更有效的去除残留的乙醇, 乙醇是否去除干净将会影响最后的洗脱效率。
10. 将离心柱转至一个新的1.5 mL离心管中, 向DNA柱的正中间加入**50~100 μL (体积>50 μL)**的ddH₂O (pH在**7.0-8.5**之间)或**Elution Buffer**, 室温放置2分钟, 13,000 rpm 离心1分钟, 洗脱质粒DNA。将洗脱液再加入到柱中, 在13,000 rpm 离心1分钟, 收集洗脱液。
注意: 我们推荐使用Elution Buffer 进行洗脱, 因为质粒DNA在水中保存可能不稳定。提取到的质粒DNA可直接用于基因克隆、测序、酶切、文库筛选、体外转录翻译、转染HEK293细胞。若用于转染内毒素敏感性细胞株, 原代细胞及用于微注射, 建议去除内毒素(PD1212)。

附录 C E0 基因测序结果

CCGGAATTCGAAAATATAACTCAATGGAACCTTAGTGACAACGGCACAAGCGGCAT
CCAGCAAGTTATGTATCTCAGAGGGGTCAATAGGAGCTTACATGGGATCTGGCCTGA
AAAAATATGCAAGGGGGTCCCTACTCATCTGGCCACTGACACGGAAGTATAGAGA
TACGTGGGATGATGGACGCCAGTGAGAGGACGAACTACACGTGTTGTAGGTTGCAG
AGACATGAATGGAATAAACATGGATGGTGTAACTGGTACAACATAGACCCTTGGATC
CAGTTAATGAACAGGACCCAAGCAAATCTGACAGAAGGCCCTCCGGATAAAGAGT
GCGCCGTGACTTGCAGGTATGATAAAAATACCGACGTTAACGTGGTCACACAGGCT
AGGAATAGACCAACTACCCTGACTGGCTGCAAGAAAGGAAAAATTTTCATTTGC
AGGTACGATCATAGAGGGCCCATGCAATTTCAATGTATCCGTGGAGGACATCTTATAT
GGAGATCATGAGTGTGGCAGCCTGTTCCAGGACACGGCTCTGTACCTATTAGATGG
AATGACTAACACAATAGAGAAAGCCAGGCAGGGTGCGGCAAGGGTCACATCTTGG
CTAGGGAGGCAACTCAGTACTACTGGGAAGAAGCTGGAGAGAGGAAGCAAACCTT
GGTTTGGTGCCTATGCCCTCGAGCGG

附录 D E2 基因测序结果

CCGAATTCACAACCCTGAGAACAGAAGTGGTGAAGACCTTCAAGAGAGAGCGACC
TTTCCCACACAGAGTGGATTGCGTGACCACTATAGTAGAGAAAGAAGACCTGTTCT
ACTGTAAGTGGGGGGTAATTGGACATGTGTGAAAGGCAACCCGGTAACCTACGTG
GGGGGGCAAGTAAAACAATGCAAGTGGTGTGGTTTTGACTTCAAGGAGCCCGATG
GGCTCCCACATTACCCCATAGGCAAGTGCATCCTAGCAAATGAGACGGGTACAGG
GTAGTGGATTCCACAGACTGCAATAGAGATGGCGTTGTTATCAGCACTGAAGGAGA
ACACGAGTGCCAGATAGGCAACACCACCGTCAAGGTGCACGCGTTGGATGGAAGA
CTGGGCCCTATGCCATGCAGACCCAAAGAAATCGTCTCTAGTGCGGGACCTGTAAG
GAAAACCTTCTGTACTTTCAATTACACAAAGACACTAAAAACAAGTACTATGAGC
CCAGGGACAGTTATTTTCAGCAATATATGCTTAAGGGCGAGTACCAACCGAGCTGCC

作者简介

姓 名：高佩佩

性 别：女

出生日期：1993 年 04 月 02 日

籍 贯：河北省邯郸市

学习经历：

2013 年 09 月-2017 年 06 月，就读于河北农业大学动物医学院动物医学专业。

2017 年 09 月-2019 年 06 月，就读于河北农业大学研究生学院兽医专业。

获奖情况：

2017-2018 学年：获得校级二等奖学金

致 谢

炎瘴蒸如火,光阴走似车。研究生两年的学习生活即将结束,回首过去,思绪万千。首先,我要衷心感谢我的导师范京惠老师,在论文工作中给予不断的鼓励与帮助。在论文研究的过程中,范老师的悉心指导,对论文研究提出的建设性意见,开阔了我的思维。范老师严谨的治学态度和认真的工作态度,是我以后学习和工作需要坚持的品质。两年以来,范老师不仅在学业上给我以精心的指导,同时还在思想上与生活上给予我无微不至的关怀,在此谨向范老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

在河北农业大学动物医学院微生物实验室的两年来,老师与同学都给予了我莫大的帮助。感谢各位各学科老师尤其是左玉柱老师对我的指导。感谢罗尚星,刘宝京,牛山,郑常龙,郑志强,师乾凯,侯林杉等师兄师姐对我的慷慨相助,让我在两年的研究生生活中少走了许多弯路;感谢王亚文、陈少杰,袁广富,石保秋,李金灿,刘曼迪,白晓等同窗在我的学习和生活中给予的关怀与帮助,同窗谊将是我值得我一生守护的财富;感谢师弟师妹的陪伴与帮助;感谢蒋泽彪对我的鼓励与陪伴,让我得以开心快乐的完成学业。最后感谢我的家人多年来对我学业的理解和支持,鼓励我一直不断前进,为我学业的完成提供了强大的支持与保障。

最后,向所有曾经关心和帮助过我的人表示由衷的感谢和诚挚的祝福。

高佩佩

2019年6月