



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

塞内卡谷病毒中和性单克隆抗体制备及中和表位鉴定

GENERATION OF NEUTRALIZING MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST SENECA VALLEY VIRUS AND
IDENTIFICATION OF THEIR NEUTRALIZING
EPITOPES

研究生: 吕强
CANDIDATE: LV QIANG

学号
STUDENT NO. 2017302110127

专业: 预防兽医学
MAJOR: PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE

导师: 李祥敏 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR LI XIANGMIN

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二零二零年六月
JUNE, 2020

华中农业大学硕士学位论文
塞内卡谷病毒中和性单克隆抗体制备及中和表位鉴定
Generation Of Neutralizing Monoclonal Antibodies Against
Seneca Valley Virus And Identification Of Their
Neutralizing Epitopes

研 究 生：吕 强

学 号：2017302110127

指 导 教 师：李祥敏 教授

指 导 小 组：李祥敏 教授

钱 平 教授

专业：预防兽医学

研究方向：动物传染病

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2020 年 6 月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二零二零年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 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, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。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做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
签 名: 吕强		时间: 2020年6月22日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版; 学校有权保存提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p>			
学位论文作者签名: 吕强		导师签名: 李辉政	
签名日期: 2020年6月22日		签名日期: 2020年06月22日	

目录

摘要.....	i
Abstract.....	iii
缩略语表 (Abbreviation).....	v
1 文献综述.....	1
1.1 塞内卡谷病毒概述.....	1
1.2 病毒生物学特征.....	1
1.2.1 塞内卡谷病毒的分类.....	1
1.2.2 塞内卡谷病毒的基因组结构.....	2
1.2.2.1 前导蛋白 L.....	3
1.2.2.2 病毒结构蛋白 P1.....	3
1.2.2.3 非结构蛋白 P2 和 P3.....	3
1.3 塞内卡谷病毒的流行病学.....	4
1.3.1 易感动物.....	4
1.3.2 传染源和传播途径.....	4
1.3.4 流行特征.....	5
1.3.5 发生与分布情况.....	5
1.4 塞内卡谷病毒感染猪的临床症状.....	5
1.5 塞内卡谷病毒感染猪的病理变化.....	6
1.6 塞内卡谷病毒的防控措施.....	6
1.7 抗原表位的研究进展.....	7
1.7.1 抗原表位概述.....	7
1.7.2 T 细胞抗原表位的研究方法.....	7
1.7.3 B 细胞抗原表位的研究.....	8
1.7.4 塞内卡谷病毒抗原表位的研究.....	9
2 目的和意义.....	10
3 材料和方法.....	11
3.1 实验材料.....	11
3.1.1 质粒、菌种、毒株、细胞和动物.....	11
3.1.2 常用试剂和药品.....	12
3.1.3 培养基及其配制.....	13
3.1.4 缓冲液及其配制.....	14
3.1.5 仪器和设备.....	15
3.2 实验方法.....	15
3.2.1 免疫原制备.....	15
3.2.1.1 BHK-21 细胞的复苏与培养.....	15
3.2.1.2 病毒毒价测定.....	16
3.2.1.3 病毒的大量扩增.....	16
3.2.1.4 病毒的超离纯化.....	16
3.2.2 SDS-PAGE 检测方法.....	17
3.2.3 BCA 法测蛋白浓度.....	19
3.2.4 免疫 BALB/C 小鼠.....	20

3.2.5 间接 ELISA 检测方法的建立.....	20
3.2.6 免疫小鼠血清抗体水平检测.....	21
3.2.7 细胞融合试验.....	21
3.2.7.1 SP2/0 细胞的制备.....	21
3.2.7.2 免疫脾细胞的制备.....	22
3.2.7.3 饲养细胞的制备.....	22
3.2.7.4 细胞融合.....	22
3.2.8 病毒中和试验法.....	22
3.2.9 筛选阳性杂交瘤细胞.....	23
3.2.10 阳性杂交瘤细胞的亚克隆.....	23
3.2.11 单克隆抗体的 IFA 验证.....	24
3.2.12 单克隆抗体的亚型鉴定.....	24
3.2.13 腹水的制备及纯化.....	25
3.2.14 杂交瘤细胞染色体计数.....	25
3.2.15 中和单抗识别 SVV 蛋白的鉴定.....	26
3.2.15.1 病毒 RNA 的提取.....	26
3.2.15.2 cDNA 的合成.....	26
3.2.15.3 引物设计.....	26
3.2.15.4 PCR 扩增.....	27
3.2.15.5 PCR 产物的回收.....	27
3.2.15.6 目的基因与 pCAGGS/HA 载体连接.....	28
3.2.15.7 连接产物的转化.....	28
3.2.15.8 菌液 PCR 鉴定重组质粒.....	28
3.2.15.9 提取重组质粒.....	28
3.2.15.10 重组质粒双酶切及测序鉴定.....	29
3.2.15.11 瞬时转染.....	29
3.2.15.12 蛋白质免疫印记.....	29
3.2.16 抗原表位鉴定方案及引物设计.....	30
3.2.17 Western-blot 初步鉴定中和表位.....	31
3.2.18 中和单抗识别抗原表位的精确定位.....	32
3.2.19 中和表位的序列比对.....	32
3.2.20 关键性氨基酸位点鉴定.....	34
3.2.20.1 单点突变引物设计.....	34
3.2.20.2 扩增单点突变基因.....	34
3.2.21 关键性氨基酸位点的 Western-blot 验证.....	34
4 结果分析.....	36
4.1 病毒培养与纯化.....	36
4.1.1 摸索病毒扩增条件.....	36
4.1.2 超离纯化病毒.....	36
4.1.3 纯化病毒的活性鉴定.....	38
4.2 制备单克隆抗体.....	38
4.2.1 抗原最佳包被浓度测定.....	38
4.2.2 免疫鼠血清效价检测.....	39
4.2.3 中和性单克隆抗体细胞株筛选.....	40

4.3	细胞培养上清 ELISA 效价测定.....	41
4.4	病毒间接免疫荧光鉴定.....	42
4.5	单克隆抗体的亚型测定.....	43
4.6	杂交瘤细胞染色体计数.....	43
4.7	单抗腹水制备与纯化.....	44
4.8	纯化腹水的中和活性检测.....	45
4.9	中和单抗 Western-blot 分析.....	46
4.9.1	构建 SVV 结构蛋白真核表达质粒.....	46
4.9.2	蛋白质免疫印迹分析.....	47
4.10	单抗识别抗原区域的初步鉴定结果.....	48
4.10.1	PCR 扩增 VP2 基因截短片段.....	48
4.10.2	PCR 鉴定重组质粒.....	49
4.10.3	Western-blot 鉴定中和表位.....	49
4.11	单抗识别中和表位的精确鉴定结果.....	51
4.11.1	构建重组质粒.....	51
4.11.2	Western-blot 精确鉴定中和表位.....	52
4.12	SVV 不同分离株的中和表位序列比对.....	54
4.13	中和表位关键性氨基酸位点验证.....	54
4.13.1	PCR 扩增 VP2 单点突变基因.....	54
4.13.2	构建 VP2 单点突变质粒.....	55
4.13.3	Western-blot 鉴定关键性氨基酸位点.....	56
5	讨论.....	58
5.1	制备免疫原.....	58
5.2	免疫 BALB/C 小鼠.....	58
5.3	细胞融合.....	58
5.4	杂交瘤细胞的筛选.....	59
5.5	亚克隆.....	59
5.6	中和单抗的验证.....	60
5.7	中和表位鉴定的研究.....	61
5.8	中和表位关键性氨基酸位点验证的研究.....	61
6	结论.....	63
	参考文献.....	64
	致谢.....	69

摘要

塞内卡谷病毒(Seneca Valley virus, SVV)是小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*), 塞内卡病毒属(*Senecavirus*)的唯一成员。2002 年研究学者从人胚胎视网膜细胞(PER.C6)培养物的污染物中分离得到 SVV-001, 2007 年首次报道了猪群 SVV 感染与猪特发性水疱病(Porcine Idiopathic Vesicular Disease, PIVD)有关, 随后陆续在美国、巴西、中国、泰国、哥伦比亚和越南等国家也有 SVV 感染的相关报道。SVV 感染主要引起猪口腔粘膜, 鼻吻和冠状水泡和溃疡病变, 然后造成跛行, 厌食, 嗜睡等症状; 7 日龄内新生仔猪感染 SVV 的病死率约为 30%至 70%, 时常伴有腹泻症状。SVV 的结构蛋白在 SVV 感染以及产生中和性抗体的过程中起着至关重要的作用, 但对于 SVV 的中和抗体的制备和研究却没有报道。本研究旨在制备 SVV 全病毒结构蛋白的中和抗体并鉴定出中和表位, 为探索 SVV 基因组结构和功能, 和利用中和抗体对 SVV 进行免疫防治皆有深远意义。

本研究以 SVV-LNSY01-2017 株为研究对象, 用该纯化的病毒免疫 6 周龄的 BABL/C 雌性小鼠, 经过间接 ELISA 检测小鼠血清显示阳性, 进行小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞的融合。经过病毒中和试验检测、间接免疫荧光验证、染色体计数以及 Western-blot 鉴定, 成功获得 10 株对 SVV-LNSY01-2017 株具有中和作用的单克隆抗体。其中具有较高 ELISA 效价抗体分别为 2C8、3E4、4C3、6D7、6E3、6E5、7C11, 检测为低 ELISA 效价的抗体分别为 5A1、5D4、7H7。构建真核表达质粒并通过 Western-blot 鉴定发现 7 株高 ELISA 效价抗体与结构蛋白 VP2 特异性结合, 表明 VP2 含有中和表位。为了进一步鉴定 SVV 的抗原表位, 首先设计 SVV-LNSY01-2017 株 VP2 基因序列的截短片段引物, 通过 PCR 扩增后回收, 利用限制性核酸内切酶切开, 并将回收后的片段连接到 pGEX-KG 表达载体上, 构建了 8 个重组表达质粒 V1-V8。利用这些质粒做重组蛋白的诱导表达, 获得了表达 GST 和截短蛋白的融合蛋白。Western-blot 鉴定显示, 8 个重组蛋白成功表达, 同时 7 株高 ELISA 效价抗体共同识别 V5(129aa-166aa)和 V8(143aa-200aa)截短蛋白, 表明中和表位存在于 VP2 蛋白 143aa-166aa 之间。接着将此区间继续进行截短表达, 通过 Western-blot 鉴定, 最终确定线性中和表位是 VP2 蛋白 153aa-158aa (¹⁵³QELNEE¹⁵⁸)。将序列 ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸ 与在 GenBnk 下载的 26 株

SVV VP2 氨基酸序列对比，中和表位¹⁵³QELNEE¹⁵⁸在不同分离株中高度保守，仅仅在 SVA-HLJ-CHA-2016 株中存在 1 个突变位点 Q¹⁵³E。通过构建 VP2 蛋白中和表位的单点突变质粒，利用 Western-blot 检测出 Q¹⁵³、E¹⁵⁴、E¹⁵⁷ 和 E¹⁵⁸ 是中和抗体的关键性氨基酸位点。

总之，本研究成功制备了 10 株具有中和作用抗 SVV-LNSY01-2017 株的中和抗体，其中 7 株抗体特异性识别 VP2 蛋白，并鉴定出了中和表位位于 VP2 蛋白¹⁵³QELNEE¹⁵⁸，并找出了 4 个关键性氨基酸位点，有助于进一步研究 SVV 基因组的结构和功能。

关键词：塞内卡谷病毒；超离纯化；单克隆抗体；VP2 蛋白；中和表位

Abstract

Seneca Valley virus (SVV), the only member of the genus *Senecavirus* of the *Picornavirus*. Researchers isolated SVV-001 from pollutants in human embryo retinal cell cultures in 2002. And in 2007, it was reported for the first time that SVV infection in pigs is related to pig idiopathic vesicular disease. After than, there are many papers of infection about SVV have also been reported in the United States, Brazil, China, Thailand, Colombia, and Vietnam. Infections mainly cause pigs oral mucosa, nasal kiss and coronet blisters and ulcer lesions, and then lameness, anorexia, lethargy. The mortality of SVV infection in newborn piglets within 7 days is about 30% to 70%, often accompanied by diarrhea. The structural proteins in SVV play an significant role in infection and they can induce nAbs, but there are no reports on the preparation and research of SVV with nAbs. And it is significant in the further use of neutralizing antibody for immune prevention and treatment of SVV.

In this study, the SVV-LNSY01-2017 strain was used as the research object. Six-week-old BALB/C female mice were immunized with the purified virus. The mice's serum showed positive by indirect ELISA, then made fusion of mouse splenocytes and myeloma cells. After detection of virus neutralization test, indirect immunofluorescence verification, chromosome counting and Western-blot identification, 10 monoclonal antibodies with neutralizing effect on SVV-LNSY01-2017 strain were successfully obtained. The antibodies with higher ELISA titer were 2C8, 3E4, 4C3, 6D7, 6E3, 6E5, and 7C11, and the antibodies with lower ELISA titer were 5A1, 5D4, and 7H7. Eukaryotic expression plasmids were constructed and identified by Western-blot. Seven high ELISA titer mAbs were specifically bound to the structural protein VP2, indicating that VP2 contained some neutralizing epitopes. In order to further identify the epitope of SVV, the truncated fragment primers of the VP2 gene sequence of SVV-LNSY01-2017 strain were designed first. Constructed the V1-V8 recombinant expression plasmid. The fusion proteins expressing GST and truncated proteins were obtained by using these

plasmids for inducible expression of recombinant proteins. Western-blot analysis indicated that 8 truncated proteins were showed up, and 7 mAbs with high ELISA titer recognized V5 (129aa-166aa) and V8 (143aa-200aa) truncated proteins, indicating that the neutralizing epitope was present in the VP2 protein between 143aa-166aa. Then the truncated expression of this region was continued. By Western-blot identification, the linear neutralizing epitope was determined to be the VP2 protein 153aa-158aa (¹⁵³QELNEE¹⁵⁸). By comparing the amino acid sequence of sequence ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸ with twenty-six SVV strains of VP2, which was downloaded from GenBank, the neutralizing epitope ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸ is highly conserved in different isolate strains, and only one mutation site Q¹⁵³E exists in the SVA-HLJ-CHA-2016 strain. By constructing a single point mutation plasmid of the VP2 protein neutralizing epitope, Q¹⁵³, E¹⁵⁴, E¹⁵⁷ and E¹⁵⁸ were detected by Western-blot as the key amino acid sites of the neutralizing antibody.

In summary, this study successfully prepared 10 neutralizing antibodies with neutralizing anti-SVV-LNSY01-2017 strain, 7 mAbs specifically recognized the VP2 protein, and identified a neutralizing epitope located at the VP2 protein ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸. Four key amino acid positions have been identified, which will be helpful in the further study of the structure and function of SVV genome.

Keywords: Seneca Valley virus; Ultra purification; Monoclonal antibody; VP2 protein; neutralizing epitope

缩略语表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文名称
293T	Human embryonic kidney	人胚肾细胞
Amp ⁺	Ampicillin	氨苄青霉素
BHK-21	Baby Hamster Syrian Kidney	乳仓鼠肾细胞
bp, kb	Base pair, kilobase pair	碱基对, 千碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
d, h, min, s	Day, Hour, minute, second	天, 小时, 分钟, 秒钟
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧三磷酸核苷
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	细胞基础培养基
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid	乙二氨四乙酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein isohiocyanate	异硫氰酸荧光素
g, mg, μg	Gram, milligram, microgram	克, 毫克, 微克
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidine	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷
HT	Hypoxanthin-Thymidine	次黄嘌呤-胸苷
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
IgG	Immunoglobulin	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosede	异丙基硫代-β-D-半乳糖苷
Kan ⁺	Kanamycin	卡那霉素
KD	Kilodalton	千道尔顿

L, mL, μ L	Liter, milliliter, microliter	升, 毫升, 微升
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
nt	Nucleic acid	核苷酸
OD	Optical Density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Public Broadcasting Service	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
RT	Reversetranscription	逆转录
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	十二烷基硫酸钠
TCID ₅₀	Median Tissue Culture Infective Dose	半数组织培养感染量
UTR	Untranslation region	非编码区

1 文献综述

1.1 塞内卡谷病毒概述

塞内卡谷病毒 (*Seneca Valley virus, SVV*), 又称 A 型塞内卡谷病毒 (*Seneca virus A, SVA*), 是小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*), 塞内卡病毒属 (*Senecavirus*) 的唯一成员 (Leme et al 2017)。这种病毒是 2002 年美国基因治疗公司的科学研究者发现的一种污染物, 有证据表明, 病毒是通过胎牛血清或胰蛋白酶污染细胞的 (et al 2008)。通过对小核糖核酸病毒科 12 个代表性病毒属病毒进行鉴定, 此病毒具有与小 RNA 病毒科病毒相近的形态特征、分子结构和亲缘关系, 与此同时它与心病毒属 (*Cardiovirus*) 遗传关系最近。该病毒的命名来源于发现它的实验室所在的地区, 所以研究者将首次分离鉴定的新类病毒命名为塞内卡谷病毒 001 (*Seneca Valley virus 001, SVV-001*) (Segales et al 2017)。目前已知 SVV 的天然唯一宿主是猪, 感染后主要表现为蹄部, 鼻唇部, 以及口腔粘膜发生水泡性病症 (Canning et al 2016)。最初的各种 SVV 分离毒株对猪无明显的致病性, 且无大范围暴发, 反之因其具备溶瘤特性而被广泛用于肿瘤医学研究中 (Lalita et al 2007)。随后的研究表明, SVV 与猪特发性水泡病 (*Porcine Idiopathic Vesicular Disease, PIVD*) 和新生仔猪高死亡率存在紧密联系 (Gimenez-Lirola et al 2016)。自 2015 年以来, SVV 先后在巴西、美国、加拿大、泰国、中国等国家出现大面积暴发, 给生猪养殖业造成了重大经济损失, 人们这才逐渐加大对 SVV 研究的重视 (Vannuci et al 2015; Wu et al 2015; Zhang et al 2015; Saeng-Chuto et al 2018)。2015 年国内首次报道的 SVV 毒株是从广东省某发病猪场分离得到的, 命名为 SVV-CH-2015 (赵晓亚 等 2016), 随后在湖北省, 研究人员从发病猪群分离得到 SVV 病毒株 (Qian et al 2016), 此后在中国南北等多个省市均有猪群感染 SVV 的相关报道。

1.2 病毒生物学特征

1.2.1 塞内卡谷病毒的分类

塞内卡谷病毒属于小 RNA 病毒科塞内卡病毒属, 其遗传序列与心病毒属成员的进化关系最近 (Hales et al 2008)。但是它的遗传序列与 12 个代表性病毒属病毒相比较, 依旧存在比较大的不同, 因而研究者在遗传分类学上为其建立一个

新的病毒属别，故此成为小 RNA 病毒科的一名新成员。塞内卡谷病毒的外观和同科的其他病毒十分相似，病毒粒子无囊膜，直径为 27nm 左右，外形似球体，为正 20 面体球形结构（如图 1-1）（Venkataraman et al 2008）。

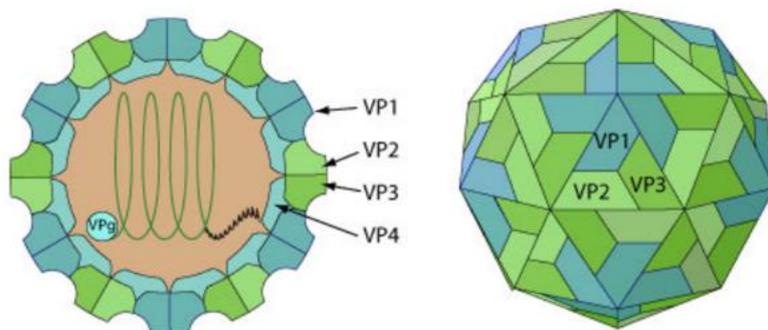


图 1-1 塞内卡谷病毒粒子平面和三维结构(Viral Zone 2015)

Fig. 1-1 The particle plane and three-dimensional structure of Seneca Valley virus

1.2.2 塞内卡谷病毒的基因组结构

塞内卡谷病毒的基因组与其他小 RNA 病毒十分相似：为单股正链 RNA。基因组全长约 7.2kb（Venkataraman et al 2008），GC 含量为 51.6%，其包含长为 666bp 的 5'非编码区（5'-*untranslated region*, 5'-UTR）和长为 71bp 的 3'非编码区（3'-*untranslated region*, 3'-UTR）（Willcocks et al 2011）；5'非编码区和 3'非编码区中间有一个长为 6543bp 的开放阅读框（*open reading frame*, ORF）；此外 3'-UTR 下游还含有约 100bp 的 poly（A）尾。塞内卡谷病毒基因组的开放阅读框编码一个长约为 2181aa 大小的蛋白，遵循小核糖核酸基因组的标准 L-4-3-4 布局，即该科病毒常见的基因组结构（Hales et al 2008），并通过病毒编码的蛋白酶加工为成熟的病毒蛋白，从 5'-UTR 至 3'-UTR 它们分别是前导蛋白 L，病毒衣壳蛋白 P1，非结构蛋白 P2 以及非结构蛋白 P3（Knowles et al 2005）。病毒衣壳蛋白 P1 编码结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3，蛋白 VP0 成熟后裂解成蛋白 VP2 和蛋白 VP4，构成病毒的衣壳（Racaniello et al 2007）。非结构蛋白 P2 编码 2A/2B/2C 三种非结构蛋白，非结构蛋白 P3 编码 3A/3B/3C/3D 四种非结构蛋白，以上 7 种非结构蛋白与病毒的致病力存在紧密联系，影响着病毒粒子基因的复制（Segales et al 2016）。基因组结构示意图见图 1-2。

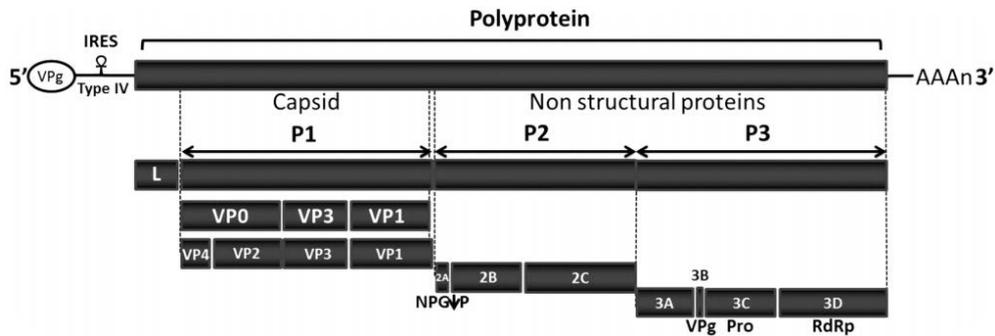


图 1-2 SVV 基因组结构 (Segales et al 2016)

Fig.1-2 The genome structure of the SVV

1.2.2.1 前导蛋白 L

塞内卡谷病毒的前导蛋白 L 全长含 99 个氨基酸, 与同样包含 L 蛋白的心病毒, 肺炎病毒, 狂犬病毒, 柯布病毒, 破骨病毒和细小病毒属别不同。它的蛋白序列缺乏蛋白水解活动所需的催化残基位点, 既不含有“锌指”构象基序 [C-x-H-x(6)-C-c(2)-C], 也不含有磷酸化酪氨酸基序 [K-x(2)-E-x(2)-Y] (黄健强 等 2019), 表明 SVV 的前导蛋白 L 可能具有独特的功能, 具体功能尚待确定。

1.2.2.2 病毒结构蛋白 P1

病毒结构蛋白 P1 可以被 3C 蛋白酶分解为三个亚基蛋白, 依次为 VP0、VP3 和 VP1, VP0 蛋白成熟之后会分解为 VP4 蛋白和 VP2 蛋白, 因此结构蛋白 VP4、VP2、VP3 和 VP1 是形成病毒衣壳的主要单位, 用于病毒衣壳的合成 (Hales et al 2008)。VP1、VP2 和 VP3 蛋白在病毒结构上形成正三角形, 以 20 个这样的正三角形组装成正 20 面体, 分布于衣壳外表面, 剩余的 VP4 蛋白处于正 20 面体内表面 (Viral Zone 2015)。有研究显示该三种蛋白亲水性较高, 更容易产生抗原表位, 病毒侵入机体更容易诱导机体产生中和抗体, 从而实现消灭入侵病毒的作用, 因而这 3 种结构蛋白在机体抵御 SVV 感染过程中发挥关键作用 (Maggioli et al 2018)。结构蛋白 VP1 的氨基酸序列比较保守, 在 SVV 不同分离株中同源性比对 95.8% 至 100%, 但是与其他小 RNA 病毒的同源性比较远, 所以 VP1 蛋白可以作为检测对象以区分其他病原体 (Gimenez-Lirola et al 2016)。

1.2.2.3 非结构蛋白 P2 和 P3

P2 和 P3 基因组区域主要编码病毒非结构蛋白, 参与病毒蛋白质的加工和病毒的复制 (Segales et al 2016)。P2 基因组可编码三种非结构蛋白 2A、2B 和 2C。其中 2A 蛋白包含小 RNA 病毒科病毒的保守基序 NPG/P 模体作为结尾, 但只有

9aa 氨基酸长度，与心病毒属 2A 蛋白的 150aa 有非常大的差别，所以研究者推测它只有核糖体跳跃功能（Hales et al 2008）。2B 蛋白全长 128 个氨基酸，其核酸序列与其他小 RNA 病毒科病毒有明显不同，然而小核糖核酸病毒的 2B 蛋白的二级结构彼此相似，并且可能在增强膜通透性方面起着作用，猜测存在滤过蛋白的相关功能（魏衍全 等 2013）。2C 蛋白全长 322 个氨基酸，是一种解螺旋类多肽，涉及病毒 RNA 的合成（Hales et al 2008）。

P3 基因组可编码 4 个非结构蛋白，分别是 3A、3B、3C 和 3D。3A 蛋白的基本功能未知。3B 区域编码 VPg 蛋白的作用类似于病毒 RNA 合成的引物（Hales et al 2008）。3C 蛋白长 211aa，是一种蛋白酶。而 3D 蛋白是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的主要成分，长度为 462 氨基酸。SVV 3C 蛋白和 3ABC、3BC、3BCD 可以不同程度地刺激 RNA 合成，还可以诱导细胞发生 caspase 依赖和不依赖途径的细胞凋亡，有利于病毒的释放与扩散（Sun et al 2016）。

1.3 塞内卡谷病毒的流行病学

1.3.1 易感动物

SVV 主要感染猪，不同性别和不同年龄阶段的猪皆都容易被感染（Leme et al 2017）。国外有研究者发现，除却猪外，牛和鼠的血清中存在 SVV 的中和抗体，表明这些动物可能是 SVV 的自然宿主（Segales et al 2017）。应当指出，有美国研究人员对该国的 60 个人类血清样品进行了 SVV 中和抗体测试，结果显示 1 个样品中和抗体呈阳性，中和抗体滴度为 1: 8，表明人类也可能成为该病毒的宿主（黄健强 等 2019；Knowles et al 2006）。

1.3.2 传染源和传播途径

SVV 最为主要的传染源是携带 SVV 病毒的感染猪，包括患病猪和无临床症状的病毒携带猪。研究者发现患病猪的囊泡液和有病症部位表现出较高的病毒含量，达到 2×10^7 - 1.2×10^{11} 基因组拷贝/mL（Leme et al 2017），结果表明，这些部位是养猪场的主要感染源，畜群与破裂的水泡或受损部位的直接接触是病毒传播的最重要方式（Guo et al 2016）。另外，根据体外实验，患病的猪可以通过口，鼻腔的分泌物，粪便和尿液排出病毒，通常持续约 4 周，并且在排出后的 1 到 5 天内达到高峰（Joshi et al 2016；Montiel et al 2016）。

1.3.3 流行特征

塞内卡谷病毒病的暴发和流行季节性不明显,有数据表明春秋两季是该病发病率上升的时期 (Flach 2017)。

1.3.4 发生与分布情况

自 1980 年起,北美,西欧和澳大利亚等国家的生猪养殖基地经常发生水泡病,经过对口蹄疫病毒等常见水疱病毒的排查,均显示为核酸阴性,所以在 SVV 没有确诊前不知晓病因 (Pasma et al 2008; Singh et al 2012)。一直持续到 2002 年,国外研究人员成功分离鉴定得到了世界上首例塞内卡谷病毒株 SVV-001,并将其分类至小 RNA 病毒科,新增一个塞内卡谷病毒属 (Hales et al 2008)。2007 年暑期,美国某屠宰场发现生猪出现行动迟缓症状,并且出现典型的水疱症状,经荧光定量 PCR 检测发现猪群感染了塞内卡谷病毒 (Pasma et al 2008)。2014 年 11 月起,巴西爆发了 SVV 有关的水疱疾病,造成 30%至 70%新生仔猪急性死亡 (Vannucci et al 2015)。2015 年初,美国多个州均确诊猪群暴发 SVV 感染,导致了許多 7 日龄内新生仔猪的死亡 (Leme et al 2016)。在中国境内,2015 年广东省某些猪场首次被证实暴发 SVV 疫情,病猪出现水疱症状、新生仔猪大量死亡,2016 年初,湖北省某养猪场也被确诊发生 SVV 感染 (张永宁 等 2017.)。

1.4 塞内卡谷病毒感染猪的临床症状

成年猪的临床表现相对较轻,病程持续约 1-2 周,但可能会出现厌食,嗜睡和发烧等症状,并且在早期猪中可以检测 40°C 的高烧。(Alexandersen S et al 2012)。病猪的口腔黏膜会出现大小不一的水疱,感染猪出现行动迟缓症状,猪蹄蹄壁出现溃疡性病变,严重时可能造成蹄壳脱落 (Vannucci et al 2015; Leme et al 2016)。发病仔猪常出现昏睡、精神沉郁等症状,腹泻症状时常发生,体温一般无明显变化,不同农场仔猪死亡率有较大差别,但主要影响 4 日龄内的幼猪 (Delay J 2015)。大约 4%至 60%的患病仔猪腹泻持续 1 至 5 天 (Zhang J et al 2015)。受影响的母猪场出现新生仔猪死亡率的突发性增长,但于 4-10d 内恢复正常死亡率水平 (花群俊 等 2019)。



图 1-3 SVV 感染的临床症状 (Leme et al 2017)

Fig. 1-3 The clinical and pathologic outcomes of SVV infection

1.5 塞内卡谷病毒感染猪的病理变化

猪感染 SVV 后死亡, 在进行病亡剖检时, 发现腹泻的仔猪中有很一部分表现出皮下或肠系膜水肿, 并且大多数仔猪的胃中存留大量母乳 (Steven et al 2017)。小肠和大肠的内容物具有流体稠度, 肠粘膜没有肉眼可见的病变 (Segales et al 2017)。个别感染案例还可见浆液纤维素性腹膜炎、心包炎, 局部广泛性空肠炎和局灶性胃溃疡 (花群俊 等 2019; Alais et al 2017)。猪 SVV 感染后第 3 至 7 天, 淋巴结、脾脏、扁桃体出现淋巴样增生、肺脏膨胀不全, 并伴有弥漫性充血 (Joshi et al 2016)。

1.6 塞内卡谷病毒的防控措施

当前还没有塞内卡病的有效疫苗, 也没有针对该病的有效治疗手段。一些学者通过反向遗传学构建了克隆的 KS15-01 菌株的载体 pKS15-01-克隆, 为 SVV 疫苗的应用开发提供了坚实的物质基础 (Zhen HC et al 2016)。与此同时, 中国学者首次通过 BHK21 细胞旋转瓶培养了 CH-FJZZ-2017 病毒株, 缩水甘油醚灭活剂灭活后, 用油乳化佐剂乳化并以每只动物 2g 的剂量免疫, 可以产生较高滴度的中和抗体 (Yang F et al 2018)。依据当前研究结论可以确定, SVV 的危害性可防可控, 它的危害性不比口蹄疫病毒造成的结局, 基本上感染 SVV 的大猪, 架子猪, 成年母猪等恢复良好, 不会引起严重的公共卫生后果和经济损失, 但

SVV 感染猪的临床症状与口蹄疫病毒极其相似，所以在排除卫生安全问题前需要重视疫病排查（赵晓亚 等 2016）。据报道，美国加利福尼亚州已经开启了 SVV 疫病防控专项监测项目，其农业部也告知生产者或牧民兽医们如果发现在猪鼻子上出现水泡，冠状带、蹄垫或指间有病变或充血，则需要向州或联邦动物疾病控制中心报告此发现，从而开始调查以排除口蹄疫的存在（Schulz et al 2015）。据报道，过氧化氢（1: 20 稀释）在 10 分钟内迅速杀死塞内卡谷病毒，过氧化氢可用于消毒猪栏和周围环境（Hole KF et al 2017）。我国虽已发现该病，但研究资料不多，诊断方法不成熟，因此，有必要加强流行病监测，建立诊断技术，做好技术储备，制定相应的应急预案，在发生 SVV 疫情时可参考口蹄疫的防控措施进行防控（花群俊 等 2019）。

1.7 抗原表位的研究进展

1.7.1 抗原表位概述

当病原体侵入动物体内，机体发生免疫反应，在这一过程中，抗原分子起着刺激机体产生特异性抗体的作用。实际上，抗原不是通过完整的分子来发挥作用的，它的特异性和功能往往需要借助抗原内部的特定氨基酸排序来完成，这样的一组特定氨基酸排序被研究者称为抗原表位。它是指在抗原分子中能够诱导机体发生免疫反应的一段独特的氨基酸序列和空间构象。抗原表位一般可依据结构性质细分为空间构象表位和线性表位，蛋白质变性可导致构象表位丢失，而线性表位不会；由抗原结合受体细胞的不同，表位再区分为 T 细胞表位和 B 细胞表位（Anahit G et al 2014）。

1.7.2 T 细胞抗原表位的研究方法

T 细胞常常识别结合到主要组织相容性复合体（*Major Histocompatibility Complex*, MHC）分子上的肽段，随即形成肽-MHC 融合体，因此对于 T 细胞表位的研究一般是从 MHC 分子入手（Bond et al 2001）。目前，计算机算法与实验技术相结合的方法已经广泛应用于各种免疫抗原的 T 细胞表位鉴定（刘涛 2007）。细胞毒性 T 细胞（*Cytotoxic T lymphocyte*, CTL）通过识别 MHC-I 类分子提成的抗原表位而杀伤靶细胞，使用与 MHC-I 类分子结合的多肽基序策略已成功预测了一些病原体的 CTL 表位（Larsen et al 2005）。合成肽法通过生物公

司合成重叠短肽，经过间接 ELISA 试验确定抗体识别的肽段，哪个肽段平均光密度最高，则此肽段含有相应表位，后续将此肽段通过 N 端和 C 端进一步截短并合成短肽做检测可得到最小被识别肽段，即获得 T 细胞抗原表位；但此法筛选过程麻烦，工作量较大，且花费较高。噬菌体展示技术可从组合库中噬菌体上数十亿个展示肽的复杂混合物库中选择高亲和力目标结合肽，并且可以通过生物淘选过程进一步丰富；事实证明，它是筛选具有高亲和力和选择性肽的有力技术，因此它的发明者 George Smith 获得了 2018 年诺贝尔化学奖；该方法的核心在于生物淘选，主要包含 5 个步骤，分别是：①文库构建和扩增-②靶标捕获步骤-③去除未结合且非特异性的噬菌体-④“洗脱步骤”其中与靶标结合的噬菌体在与低 pH 缓冲液短暂孵育后或通过竞争性洗脱进行分离-⑤“感染阶段”，将洗脱的噬菌体感染细菌以扩增选定的噬菌体，从而形成了一个新的，更具选择性的噬菌体文库，该文库应用于下一轮生物淘选（Phei ES and Er-Wei S 2019）。噬菌体展示生物淘选技术为抗原表位筛选带来诸多便利，随着技术的进步，现在可以使用结合的一级噬菌体展示筛选和二级计算优化方法来开发针对靶向实体瘤治疗领域中任何目标受体的最佳肽，因而以后该技术的使用将会逐渐广泛。

1.7.3 B 细胞抗原表位的研究

B 细胞表位，也称为抗原决定簇，是 B 细胞识别的抗原的一部分。抗体识别表位的能力已广泛用于包括免疫检测和免疫治疗在内的许多生物医学应用中。免疫原性区域的鉴定有助于理解免疫系统的机制并指导相关应用。B 细胞表位被定义为 B 细胞响应的抗原分子的一部分，对于许多免疫检测和免疫治疗应用来说都是必不可少的（De Groot AS 2006）。根据抗原决定簇的结构和与抗原决定簇相互作用的方式，可以将抗原决定簇分为两类：不连续抗原决定簇和连续抗原决定簇。抗原表面的抗原决定簇可以被特异性 B 细胞受体识别并结合。预测整个蛋白质区域或整个蛋白质中的 B 细胞表位有助于推断出有效的免疫反应，这可能会改善蛋白质工程，并有助于开发已广泛用于基于抗体亲和力结合的实验技术中的抗药物抗体（Barbosa MD et al 2007）。据估计，超过 90% 的 B 细胞表位是构象的或不连续的，由沿着病原体蛋白质序列散在的片段组成，并通过蛋白质折叠与抗体结合在一起（Van 1996）。由于整个分析必须取决于抗原结构，因此很难确定不连续的表位；基于 3D 结构预测不同抗原中不连续表位的性能相对较差，

迫切需要更好的连续 B 细胞表位预测（Ponomarenko et al 2008）。

当前，已经有许多计算机算法应用于应用于 B 细胞抗原表位预测并投入至科学研究中。最早也是最被认可的方法就是利用计算机预测肽段的亲水性区段，由于亲水性氨基酸有更多的机会暴露于表面，故而成为表位的几率就会增大（Hoop et al 1981）。通过大量数据的积累，研究者发现亲水性氨基酸与抗原分子的结合并不是绝对正相关，疏水性氨基酸也有可能成为抗原决定簇。因此，外国研究人员还逐步发展了可及性方案、抗原性方案、可塑性方案、二级结构预测、电荷分布方案（张伟 等 2012）。基于 B 细胞表位的研究方法多样化，所呈现的结果也是五花八门，因此在理论上还需要通过实验数据来证明结果，因 B 细胞表位常常为空间构象表位，蛋白变性即失效，因而研究者往往需要高纯度的活性蛋白做电镜结构分析方能获得理想的 B 细胞表位结果。

1.7.4 塞内卡谷病毒抗原表位的研究

目前尚未有塞内卡谷病毒抗原表位的相关研究进展，但对于结构蛋白 VP1 和 VP2 的相关研究却有很多报道。首先从分子结构上分析，3 种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 形成病毒的衣壳，分布于病毒粒子的外表面，它们具有较高的亲水性，因而是病毒侵入猪体时最先被免疫细胞捕获并识别蛋白；通过自身免疫反应，能够产生特异性的抗体。有外国学者利用构建的重组表达质粒，借用大肠杆菌表达出了 VP1，VP2 和 VP3 蛋白，利用镍柱纯化这 3 种蛋白后，分别将 3 种重组蛋白包被 ELISA 板，从而建立了一种能够鉴定猪塞内卡谷病毒血清抗体的间接 ELISA 方法；通过对大量确诊 SVV 的猪血清样品的检测，研究者发现单独包被 VP2 蛋白 ELISA 板的敏感性和特异性显著优于包被 VP1 和 VP3 蛋白的 ELISA 板（Dvorak et al 2017）；与此同时，他还发现该病毒结构蛋白 VP2 的免疫原性显著高于 VP1 和 VP3 蛋白（Dvorak et al 2017）。还有学者利用竞争 ELISA，病毒中和实验和间接免疫荧光试验来连续检测 SVV 感染猪血清中的抗体，对竞争 ELISA 的诊断特异性和敏感性分别为 98.2%和 96.9%，对病毒中和试验和间接免疫荧光试验分别为 99.6%和 98.2%；基于卡伯系数进行比较时，发现竞争 ELISA，病毒中和试验和间接免疫荧光试验之间存在很强的一致性（Goolia M et al 2017）。综合上述两项研究得出结论，VP2 蛋白是刺激机体产生中和抗体的最佳蛋白，同样也是抗原表位的最佳富集区域。

2 目的和意义

猪源塞内卡谷病毒性疾病是由塞内卡谷病毒引起的动物传染病，当前认为猪是该病毒的唯一宿主。自 2015 年起，SVV 在中国、北美以及巴西等国家呈现出暴发流行的趋势，对各地区的生猪养殖业造成了一定程度的经济损失，尽管 SVV 不是毁灭性疾病，但由于其临床症状与口蹄疫等疾病及其相似，因此必须进行检测以确定是否存在 SVV 感染。目前，制备单克隆抗体的技术在多种病原的检测与针对于流行病学的研究中得到了非常广泛的应用，能够制备出具有病毒中和活性的单克隆抗体具有非常重要的研究意义。当前用单克隆抗体来研究病毒蛋白的结构与功能日益广泛，用完整的病毒粒子或者病毒基因的重组蛋白作为免疫原制备单克隆抗体已经有一些报道，Yang M 等人已经制备出了以 SVV 全病毒粒子为免疫原的单克隆抗体并且应用于对猪水泡病的诊断检测中（Yang M et al 2012）。本研究希望通过细胞融合技术制备抗 SVV-LNSY01-2017 株的中和性单克隆抗体，并对制备的中和单抗识别的 SVV-LNSY01-2017 株抗原表位进行精确的定位。已经有研究发现 VP2 蛋白具有诱导机体产生中和抗体的作用（Dvorak et al 2017），但对于具有中和活性单抗的制备与研究却没有报道。因此，研究 SVV 中和性单克隆抗体，对了解 SVV 基因组的结构与功能以及进一步对塞内卡谷病的免疫防治具有非常重要的意义。

3 材料和方法

3.1 实验材料

3.1.1 质粒、菌种、毒株、细胞和动物

原核表达载体 pGEX-KG 由本实验室保存，图 3-1 为其图谱；

真核表达载体 pCAGGS/HA 由本实验室保存，图 3-2 为其图谱；

大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司；

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京擎科新业生物技术有限公司；

SVV LNSY01-2017 毒株由本实验室分离并保存；

BHK-21 细胞、293T 细胞、SP2/0 细胞均由本实验室保存；

SPF 级 BALB/C 小鼠购自华中农业大学实验动物中心。

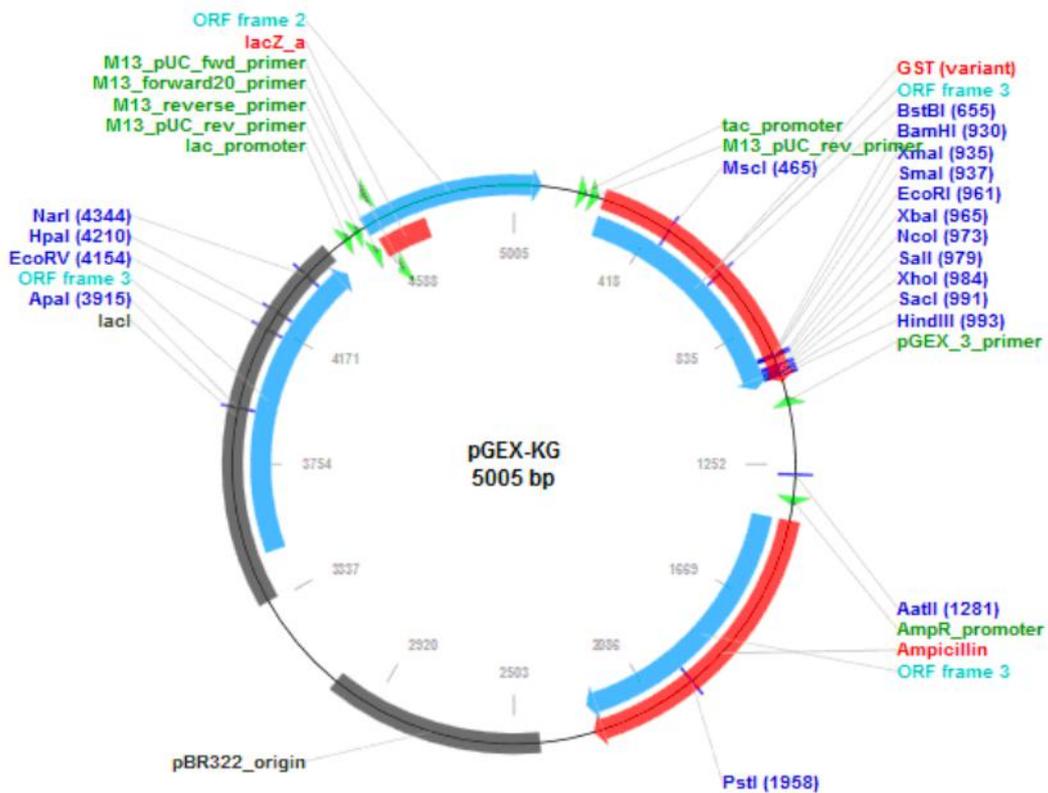


图 3-1 pGEX-KG 载体图谱

Fig. 3-1 The Map of pGEX-KG Vector

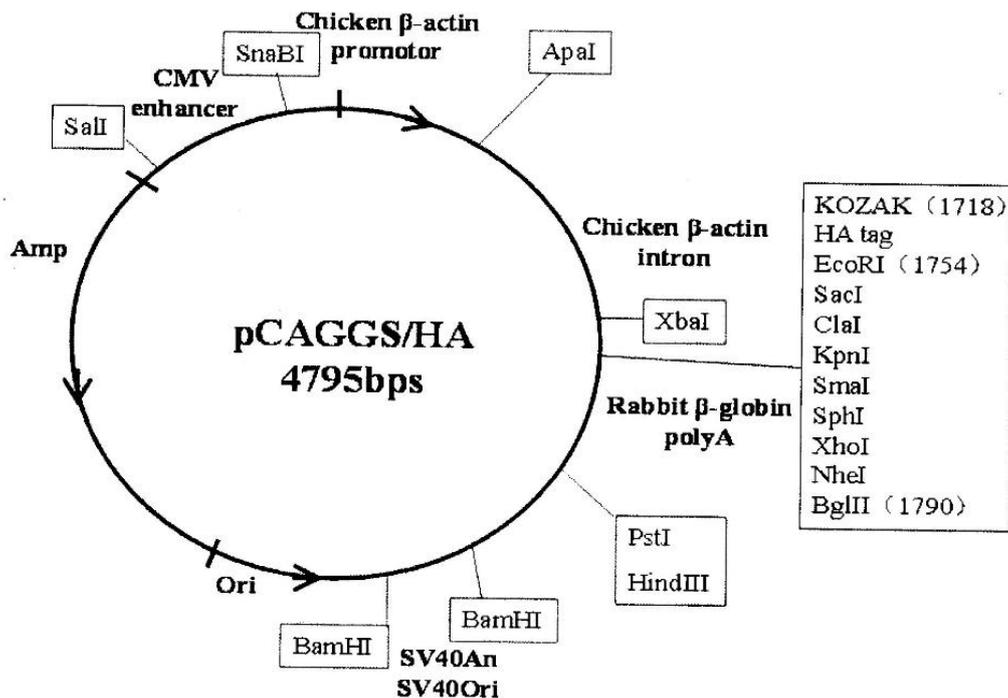


图 3-2 pCAGGS/HA 载体图谱

Fig. 3-1 The Map of pCAGGS/HA Vector

3.1.2 常用试剂和药品

SVV-VP1 兔源多抗由本实验室制备并保存；

限制性内切酶及其 Buffer、LA Taq 酶、DNA Marker、蛋白 Marker 购自大连宝生物公司（TaKaRa）；

Plasmid Mini Kit、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自武汉天根生物有限公司；

PierceTM BCA Protein Assay Kit 购自 Thermo 公司；

单抗亚类鉴定酶即用装购自北京博奥龙免疫技术有限公司；

双抗（青链霉素溶液）、0.25%EDTA 的胰酶溶液、Bovine Serum Albumin, Fraction V（BSA）购自 GenView 公司；

胎牛血清（Fetal Bovine Serum）购自 Invitrogen 公司；DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基购自 HyClone 公司；

50%PEG、HAT（HT）培养基干粉、Hisopaque-1083 淋巴细胞分离液、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、蔗糖购自 Sigma-Aldrich 公司；

鼠源抗 GST 标签一抗、鼠源抗 HA 标签一抗、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗购自武汉安特捷生物有限公司；

ELISA 显色液及终止液购自武汉科前生物股份有限公司；

Cy3 Goat Anti-Mouse IgG、Cy3 Goat Anti-Rabbit IgG 购自 ABclonal 公司；

SuperSignal Chemiluminescent Substrates 显色液购自 Thermo 公司；

吉姆萨染液、DMSO、结晶紫、考马斯亮蓝购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；

琼脂糖购自武汉擎科生物技术有限公司；

Gel Stain (10000×) 购自北京全式金生物技术有限公司。

3.1.3 培养基及其配制

LB 液体培养基：称取胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，NaCl 5g，加入 800mL ddH₂O，充分搅拌溶解，再用 5mol/L NaOH 调节 pH 值到 7.0-7.2，然后定容至 1L，灭菌后保存备用；

LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中加入琼脂粉至终浓度为 1.5%，灭菌后待其冷却至室温，加入需要的 1% 抗生素，混合均匀后倒平皿，放 4℃ 冰箱保存备用；

RPMI-1640 完全培养基：在 RPMI-1640 基础培养基加入 20% 胎牛血清、1% 双抗，混匀后放于 4℃ 保存备用；

HAT 培养基：HAT 粉末用 10mL RPMI-1640 完全培养基重悬后，按 50 倍体积稀释使用，混匀后放于 4℃ 保存备用；

HT 培养基：HT 粉末用 10mL RPMI-1640 完全培养基重悬后，按 50 倍体积稀释使用，混匀后放于 4℃ 保存备用；

DMEM 基础培养基：DMEM 粉剂 13.5g 溶于 800mL 三蒸水中，轻轻搅拌至完全溶解后加入 3.7g NaHCO₃、5.96g HEPES，定容至 1L，0.22μm 滤膜过滤除菌，4℃ 保存备用；

DMEM 完全培养基：在 DMEM 细胞基础培养液加入 10% 的新生牛血清、1% 双抗，混匀后放于 4℃ 保存备用；

DMEM 维持培养基：在 DMEM 细胞基础培养液中加入 2% 的新生牛血清、1% 双抗，混匀后放于 4℃ 保存备用；

细胞冻存液：在细胞完全培养基中加入 10% DMSO、40% RPMI-1640 培养基及 50% FBS，混匀后使用，现配现用。

3.1.4 缓冲液及其配制

胰酶稀释液: NaCl 8g、KH₂PO₄ 0.2g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.15g、EDTA desalt 0.2g、Phenol red 0.01g, 依次溶于 800mL ddH₂O 中, 待完全溶解后, 定容至 1L, 0.22μm 滤器过滤除菌, 4°C 保存备用;

氨苄青霉素 (Amp⁺): 称取 0.5g Amp⁺溶于 10mL ddH₂O 中, 使终浓度为 50mg/mL, 待粉剂全部溶解后 0.22μm 滤器过滤除菌, 适量小份分装, -20°C 避光保存;

卡那霉素(Kan⁺): 称取 0.1g Kan⁺溶于 10mL ddH₂O 中, 使终浓度为 10mg/mL, 待粉剂全部溶解后 0.22μm 滤器过滤除菌, 适量小份分装, -20°C 避光保存;

IPTG 诱导剂: 称取 2.38g IPTG, 用 8mL ddH₂O 充分溶解后, 定容至 10mL, 使终浓度为 1mol/L, 待粉剂全部溶解后使用 0.22μm 滤器过滤除菌, 小份分装, -20°C 避光保存;

氧化型谷胱甘肽: 0.3g 氧化型谷胱甘肽粉末, 用 8mL ddH₂O 充分溶解后, 定容至 10mL, 分装保存于 -20°C 备用, 需现配现用;

1mol/L Tris-HCl: 121.1g Tris, 42mL 浓 HCl, 用 800mL ddH₂O 充分溶解后定容至 1 L 于室温保存备用;

10×TE (pH=8.0): 100mL 1mol/L Tris-HCl (pH=8.0), 20mL 500mmol/L EDTA (pH=8.0), 用 800mL ddH₂O 充分溶解后定容至 1 L, 室温保存;

50×TAE: 242g Tris, 37.2 g EDTA Na₂, 57.1mL 冰醋酸, 用 800mL ddH₂O 充分溶解后定容至 1 L, 室温保存;

5×Tris-Glycine Buffer: 15.1g Tris、94g Glycine、5g SDS, 用 800mL ddH₂O 充分溶解后定容至 1 L, 室温保存;

电转缓冲液: 称取 2.9g 甘氨酸、5.8g Tris、0.37g SDS、200mL 甲醇, 蒸馏水定容至 1L;

TBS Buffer (pH=8.0): 称取 1.21g Tris, 8.775g NaCl 溶于 900mL ddH₂O 中, 调节 pH 值至 8.0, 蒸馏水定容至 1L, 室温保存;

TBST: 含 0.05% Tween-20 的 TBS;

Western-blot 封闭液: 含 5% 脱脂牛奶的 TBST;

考马斯亮蓝染色液: 甲醇、冰乙酸、蒸馏水以 9:9:2 的比例加入, 然后称取

2.5g 考马斯亮蓝 R250 溶于其中，定容至 1L，室温保存；

考马斯亮蓝脱色液：甲醇 450mL，冰乙酸 100mL，蒸馏水定容至 1L，室温保存；

IFA 封闭液：取 1g BSA 溶解于 100mL PBS 中，4°C 保存备用；

ELISA 包被液：1.59g Na₂CO₃，2.93g NaHCO₃，用 800mL ddH₂O 充分溶解后定容至 1 L，调节 pH 至 9.6，4°C 保存；

10×PBS：80g NaCl，2g KCl，2g KH₂PO₄，29g Na₂HPO₄·12H₂O，用 800mL ddH₂O 充分溶解，调 pH 值至 7.4，定容至 1L，高温高压灭菌，室温保存；

PBST：100mL 10×PBS，700mL ddH₂O，充分混匀后，加入 0.5mL Tween-20，定容至 1 L，室温保存；

ELISA 封闭液：取 2g BSA 溶解于 100mL PBST 中，4°C 保存备用。

3.1.5 仪器和设备

光学显微镜（OLYMPUS CKX31）；

-80°C 超低温冰箱（Thermo）；

台式高速离心机（Eppendorf5415R，Eppendorf5810R）；

二氧化碳培养箱（SANYO MCO-18AIC）；

Bio-Rad Chemi Doc™ XRS+ 凝胶成像仪；

生化培养箱、超净台（哈东联）；

脱色摇床、核酸电泳仪（北京六一仪器厂）。

3.2 实验方法

3.2.1 免疫原制备

3.2.1.1 BHK-21 细胞的复苏与培养

提前打开水浴锅，温度调至 37 °C，从液氮罐中取出冻存管，放入一次性 PE 手套中（防止水进入冻存管），迅速放入已调好温度的水浴锅中，持续快速摇动使冻存管内容物快速融化。

融化后，于超净台内打开冻存管，用 1ml 移液枪将其冻存的细胞移至 15ml 离心管中，补加 10ml 基础培养液，放置于低速离心机中进行离心，离心条件：1000r/min，5min。

弃上清，用 1ml 新鲜的培养液将细胞重悬，并移至 T25 细胞瓶中，DMEM 完全培养基体积补至 5ml。

将细胞瓶放置于 37 °C 培养箱进行培养，6h 内禁止移动。

3.2.1.2 病毒毒价测定

提前一天传代细胞于 96 孔微量培养板中（100 μ L/孔），使细胞在次日实验时养成单层。

使用无血清含 1% 双抗的 DMEM 基础培养基在 1.5ml EP 管中将 SVV-LNSY01-2017 病毒做连续 10 倍稀释，稀释倍数从 10^1 - 10^{10} 。

第二天弃去 96 孔板原孔中的细胞培养液，将稀释好的病毒液(10^1 - 10^{10})接种到 96 孔微量培养板中，每一稀释度接种一纵排共 8 孔（每一稀释度 7 个重复），每孔接种 100 μ l。设正常细胞对照，做两纵排。

吸附 1-2h 后弃去病毒液，96 孔板内换成含 2%血清、1%双抗的 DMEM 基础培养液进行培养。

逐日观察并记录结果，一般需要观察 3-4 天。

3.2.1.3 病毒的大量扩增

BHK-21 细胞传代至 T175 培养瓶中，加入 30mL DMEM 完全培养基，于 37°C、5%CO₂ 条件下培养至细胞占瓶底面积约 80%。

将培养基换成不含血清的 DMEM 基础培养液，加入 MOI=0.01 的 SVV-LNSY01-2017 病毒，37°C、5%CO₂ 条件下感染细胞 1 h。

将病毒液弃去，换成 DMEM 维持培养基，37°C、5%CO₂ 培养约 60h 至细胞 70-80%左右病变呈球形漂起，即可收获病毒。

3.2.1.4 病毒的超离纯化

去细胞碎片：细胞扩增 SVV-LNSY01-2017 病毒后，细胞和上清混合液进行初步离心，4°C、8000 r/min 离心 30 min，去除细胞碎片。

超离浓缩：SW45Ti 的离心管（38.5mL）将病毒上清进行超速离心，4°C、30000 r/min 离心 3h，离心管底用 20%蔗糖（用 0.22 μ m 滤器过滤）垫底（37mL 病毒上清液+ 1.5mL 20%蔗糖），超离后用 PBS（pH=7.4）重悬沉淀。

重悬后的样品在转盘上 4°C 过夜，充分溶解沉淀；次日在上样前 4°C、12000 r/min 离心 10 min；提前配制 4 种浓度梯度的蔗糖溶液 65%、50%、35%、20%，

用 PBS (pH=7.4) 配制, 并用 0.22 μ m 滤器过滤备用。

铺蔗糖梯度: 在 SW32Ti 离心管中从上至下依次铺浓度为 20%、35%、50%、65% 的蔗糖溶液。先向管底部注入 2.5mL 20%蔗糖, 再用含细长针头的注射器插入管底部, 缓慢加入 2.5 mL 35%蔗糖, 避免力量过大, 冲散两层的界限。以此类推, 随后依次注入高浓度的蔗糖, 四层铺好后在 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置过夜形成自然梯度 (让四层蔗糖自然沉降, 充分展开, 形成自然梯度), 注入蔗糖的过程避免出现气泡。

蔗糖梯度离心: 次日沉淀样品 10000r/min、10min 离心, 用移液器将样品上清液沿着液面加入已经铺好的蔗糖最上层, 进行蔗糖梯度离心, 4 $^{\circ}$ C、40000 r/min 离心 3h (此时需在离心软管上标记相应的蔗糖梯度条带的大小位置)。

取样: 超离结束后, 关闭室内灯, 用手机的灯照明观察是否有亮带以及亮带的位置 (SW32Ti 离心管垂直地放在光源正上方), 用移液枪从上而下吸取 500-600 μ L 液体放在 1.5mL EP 管中并进行标记。

脱蔗糖: 将 SDS-PAGE 检测后判定有病毒带的管数进行合并加入 SW32Ti 的离心管中, 加入 PBS (pH=7.4) 进行稀释, 4 $^{\circ}$ C、40000 r/min 离心 3h, 离心结束后将离心管倒置, 控干管口以及管身的液体, 用 PBS (pH=7.4) 重悬沉淀 (重悬总体积不超过 1mL), 在转盘上 4 $^{\circ}$ C 过夜。利用 SDS-PAGE 检测病毒颗粒的纯度, 使用 BCA 法测定病毒粒子的结构蛋白总蛋白浓度。

3.2.2 SDS-PAGE 检测方法

设备检漏: 将电泳玻璃板按顺序装好并固定, 在电泳玻璃板间注满蒸馏水, 静置 15-20min, 观察是否有水浸出, 若无则进行下一步操作, 反之, 则拆除进行重新安装, 并重复检漏至无液体浸出。

分离胶的制备: 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度, 不同浓度的 SDS-PAGE 分离胶的最佳分离范围如表 3-1。

表 3-1 最佳分离胶范围

Table 3-1 Optimal separation gel range

蛋白质分子质量范围 (KD)	适宜的凝胶浓度
>100	8%
30-100	10%
10-30	12%
<10	15%

将检漏的蒸馏水倒出，按下表 3-2 进行 SDS-PAGE 分离胶的配制。如室温高于 30℃，可适量减少 TEMED 30-50%，防止胶过快凝结；如室温低于 20℃，可适量增加 TEMED 30-50%，防止胶过慢凝结。常用分离胶的浓度为 10%。所有试剂加入烧杯中，充分混匀后，迅速进行注胶，注胶过程要平稳，避免产生气泡，注胶完成后用蒸馏水进行水封（水封的目的是为了使分离胶上延平直，并排除气泡，且防止氧化），凝胶聚合好的标志是胶与水层之间形成清晰的界面。

表 3-2 分离胶配方

Table 3-2 Formula of separation gel

试剂	电泳凝胶浓度			
	8%	10%	12%	15%
H ₂ O (mL)	4.63	4.00	3.30	2.30
30%Acr-Bis (29:1) (mL)	2.67	3.30	4.00	5.00
1.5mol/L Tris.cl (pH 8.8) (mL)	2.50	2.50	2.50	2.50
10%SDS (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10
10%AP (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10
TEMED (μL)	4	4	4	4
总体积 (mL)	10			

浓缩胶的制备：分离胶制备完成后，静置 60-90min，确保分离胶凝结完全后，倒出水封液体并用滤纸把剩余的水分吸干，按表 3-3 进行 SDS-PAGE 浓缩胶的配制。所有试剂加入烧杯中，充分混匀后，连续平稳加入浓缩胶至离边缘 5mm 处，迅速插入样梳（样梳需一次平稳插入，梳口处不得有气泡，梳底需水平），静置 40-60min。

表 3-3 浓缩胶配方

Table 3-3 Formula of concentrated gel

试剂	浓度 (5%)	
H ₂ O (mL)	4	2
30%Acr-Bis (29:1) (mL)	1	0.5
1.0mol/L Tris.cl (pH 8.8) (mL)	1	0.5
10%SDS (μL)	80	40
10%AP (μL)	60	30
TEMED (μL)	8	4
总体积 (mL)	6	3

制样：吸取经预处理后样品 25μl 与 25μl 2×上样缓冲液混合均匀后，于沸水煮 10min 去掉亚稳态聚合，冷却后 10000rpm 离心 1min。

上样：浓缩胶凝结后，向上槽内倒入适量电泳缓冲液，拔出样梳（要使锯齿孔内的气泡全部排出，否则会影响加样效果），向每孔内加样 10μl（加样时移液枪要始终竖直，且加样迅速，为避免边缘效应，最好选取中部孔注样）。

跑胶：加样完成后，在电泳槽内加入适量电泳缓冲液，连接好冷凝水，接通电源，进行电泳，稳压 90V，电泳 90min 左右，进入分离胶后，电压改为 120V，待溴酚蓝距凝胶边缘约 5mm 时，停止电泳。

凝胶板剥离与固定：电泳结束后，取开玻璃板，将凝胶板做好标记后放在大培养皿内（剥胶时要小心，将凝胶保持完好），用蒸馏水小心清洗 1-3 次，加入固定液进行固定 40-60min，倒出固定液，蒸馏水清洗 3-5 次。

染色：固定清洗结束后，倒入染色液，染色 40-60min。

脱色：染色结束后，蒸馏水清洗 3-5 次，倒入脱色液进行脱色，30-60min 后更换一次脱色液后，脱色至蛋白条带清晰即可。

清洗：电泳结束后，将电泳玻璃版及烧杯仔细清洗，并用蒸馏水进行漂洗后，将电泳所用物品归置原位。

3.2.3 BCA 法测蛋白浓度

配置 BCA 工作液：将 BCA 定量试剂盒内的 A 液和 B 液摇晃均匀，以 A:B=50:1 的比例配置 BCA 工作液，充分混匀，BCA 工作液室温下 24h 内稳定，需现配现用。

配置不同浓度的标准蛋白液（BSA）：1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL 共 5 个标准浓度。稀释液依据待测蛋白样品的溶剂

而定。

取各浓度标准蛋白液 50 μ L 和待测蛋白样品 50 μ L 分别加入 96 孔酶标板，随后向各孔蛋白液中加入 200 μ L 的 BCA 工作液，混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。静置结束后，冷却至室温，用酶标仪测定 OD_{562nm} 处的吸光值，并制作标准曲线。

根据待测样品的吸光值，对比标准曲线，计算待测蛋白的浓度。

3.2.4 免疫 BALB/C 小鼠

以每只小鼠免疫 40 μ g 全病毒抗原为基准，具体免疫方法如下：取 40 μ g 纯化的 SVV-LNSY01-2017 病毒颗粒与等体积弗氏（不）完全佐剂乳化后，通过颈背部皮下多点注射方式对 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/C 小鼠进行免疫，第三次免后 10d 对小鼠进行断尾采血，分离血清后检测抗体 ELISA 效价水平，进而判断是否需要第 4 次免疫。融合前 3d，对免疫小鼠腹腔注射 40 μ g 全病毒抗原（不加佐剂）进行加强免疫。免疫程序如表 3-1 所示：

表 3-4 小鼠免疫程序

Table 3-4 Immunization schedule for mice

免疫次数	免疫时间	免疫方式	免疫剂量	佐剂名称
首次免疫	第 0 天	颈背部皮下多点注射	40 μ g/只	弗氏完全佐剂
二次免疫	第 14 天	颈背部皮下多点注射	40 μ g/只	弗氏不完全佐剂
三次免疫	第 28 天	颈背部皮下多点注射	40 μ g/只	弗氏不完全佐剂
加强免疫	融合前 3 天	腹腔注射	40 μ g/只	不加佐剂

3.2.5 间接 ELISA 检测方法的建立

通过棋盘法确定抗原的最佳包被浓度及血清最佳稀释倍数：

小鼠免疫完成后，尾静脉断尾采血，将血液于 37 $^{\circ}$ C 放置 30min，随后 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 4h，次日 4 $^{\circ}$ C、5000r/min 离心 10min，分离上清即为待检阳性血清。

用包被液将纯化的 SVV 病毒颗粒及 BHK-21 细胞对照从 4 μ g/mL 倍比稀释至 0.125 μ g/mL，纵向包被 96 孔酶标板，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

次日弃去包被液，用 PBST 洗涤 5min，重复 3 次，加入封闭液，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。

弃去封闭液，用 PBST 洗涤 5 min，重复 3 次，将阳性血清从 1:200 倍比稀释至 1:25600，共 8 个稀释度，分别横向加入 96 孔酶标板中，100 μ L/孔，同时设置阴性小鼠血清为阴性对照，用同样的方法稀释到同样的倍数，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

弃去阳性血清和阴性血清，用 PBST 洗涤 5min，重复 3 次，加入 1:5000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

弃去二抗，用 PBST 洗涤 5min，重复 3 次，每孔加入底物液 A 50 μ L，底物液 B 50 μ L，室温避光静置 10min 后加入 50 μ L 终止液终止反应，用酶标仪测定 OD_{630nm} 值。

3.2.6 免疫小鼠血清抗体水平检测

按抗原最佳包被浓度包被 SVV 病毒颗粒及 BHK-21 细胞对照，将分离得到的待检阳性血清和空白小鼠阴性血清从 1:100 倍开始依次 2 倍倍比稀释至 1:12800 作为一抗，然后用建立的间接 ELISA 方法检测免疫小鼠的血清效价。

当待检血清与阴性血清的 OD_{630nm} 比值(P/N) \geq 2.1，且待检血清的 OD_{630nm} \geq 0.4 时的最大稀释倍数为该免疫小鼠的血清效价。

若免疫小鼠血清效价达到 1: 12800，则可将小鼠安乐死进行细胞融合。

3.2.7 细胞融合试验

3.2.7.1 SP2/0 细胞的制备

将实验室冻存的 SP2/0 细胞复苏，用 RPMI-1640 完全培养基进行培养，待细胞长势良好且细胞计数达 1×10^7 cells 左右，将细胞收集起来，用 300 μ L RPMI-1640 基础培养基重悬，颈背部皮下多点注射 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠。

待 10-14 d 左右，可眼观小鼠背部长出一定大小的实体瘤，将小鼠进行安乐死；用 75%酒精浸泡 5 min，在超净台上将小鼠固定，实体瘤的位置向上，无菌取出实体瘤，置于匀浆器中，加 5mL RPMI-1640 基础培养基充分研磨后，补加 10mL RPMI-1640 基础培养基并混匀，静置 10 min；轻轻吸取 5mL 上层细胞悬液至无菌离心管中备用，匀浆器中再补加 10mL RPMI-1640 基础培养基并混匀，静置 10 min；轻轻吸取 10 mL 上层细胞悬液至无菌离心管中备用，如此重复两次。

将离心管中的细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min 后去上清，用 17.5 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞沉淀；于另一无菌 50 mL 离心管中加入 17.5 mL 的淋巴细胞分离液，将重悬的骨髓瘤细胞悬液沿管壁轻轻地加在分离液上，1000 r/min 离心 10 min；吸取两界面分界处致密的白色细胞层于另一离心管之中，用 RPMI-1640 基础培养基洗涤 2 次，然后用 10 mL RPMI-1640 基础培养基重悬，计数后备用。

3.2.7.2 免疫脾细胞的制备

取加强免疫后的 BALB/c 小鼠一只，眼眶放血处死，收集血液并分离出血清，即为阳性血清。致死的小鼠于 75%酒精中浸泡 5min，移入超净台，固定于解剖板上，左后腿交叉向上，暴露左侧腹部。用镊子提起腹部皮肤，剪开腹部皮肤，暴露腹膜，再剪开腹膜，暴露腹腔器官，找到脾脏，无菌取出脾脏，剥离被膜及被膜上的结缔组织。放入匀浆器，加入 5mL RPMI-1640 基础培养基研磨，再补加 10mL RPMI-1640 基础培养基充分混匀，静置 10min。轻轻吸取 10mL 上层细胞悬液至另一离心管中备用，匀浆器中再补加 10mL RPMI-1640 基础培养基并混匀，静置 10min。轻轻吸取 10mL 上层细胞悬液至另一离心管中备用，如此重复 2 次。将离心管中的细胞悬液 1000r/min 离心 10min 后去上清，用 10mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞沉淀，计数后备用。

3.2.7.3 饲养细胞的制备

取空白的 BALB/c 小鼠一只，眼眶放血处死，收集血液并分离出血清，即为阴性血清。饲养细胞的制备方法与免疫脾细胞的制备方法相同，用 50mL 的 HAT 培养基将饲养细胞重悬，96 孔板每孔 100 μ L，共 10 块板。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.2.7.4 细胞融合

将 SP2/0 细胞悬液（ $1-2 \times 10^7$ cells）与免疫脾细胞悬液（ 1×10^8 cells，一个脾脏的细胞量大约为 1×10^8 ）在 50mL 离心管中混匀，1000r/min 离心 10min。弃去上清后，用灭菌滤纸吸取残留液体，轻弹管底使细胞松动，在 37 $^{\circ}$ C 水浴环境下，1min 中内缓慢加入 800 μ L 50%PEG，边加边轻轻搅拌；再继续搅拌 1min；在第 3min 加入 1mL 预热到 37 $^{\circ}$ C 的 RPMI-1640 基础培养基；第 4-5 min 加入 3mL RPMI-1640 基础培养基；第 6min 加入 5mL RPMI-1640 基础培养基；最后缓慢加入 30mL RPMI-1640 基础培养基。1000r/min 离心 10min，弃去上清后，37 $^{\circ}$ C 放置 5-8min。将细胞用 75mL HAT 培养基重悬，接于之前制备的饲养细胞的 96 孔板内，每孔 150 μ L，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.2.8 病毒中和试验法

固定病毒稀释抗体法：

在 96 孔培养板实验组每孔加 50 μ L 空白 RPMI-1640 培养基，补加 50 μ L 杂

交瘤细胞培养上清（4个重复），然后依次2倍比稀释血清至1:128（最终每孔50 μ L液体）。

将200 TCID₅₀的病毒液10倍稀释至0.2 TCID₅₀，实验组每孔加入200 TCID₅₀的SVV LNSY-01-2017病毒液50 μ L，同时做分别加入50 μ L 200/20/2/0.2 TCID₅₀病毒液的病毒对照组和只加RPMI-1640培养基的细胞对照组。

前后左右水平轻轻混匀（不要将液体摇到其他孔），将培养板放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中吸附90min。

吸附完成后每孔加入BHK-21细胞悬液100 μ L，继续放置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养，逐日观察并记录结果，一般要观察2-3d。以能完全抑制细胞病变的抗体最大稀释度作为该单抗的中和效价。

3.2.9 筛选阳性杂交瘤细胞

细胞融合后第4天，每孔补加50 μ L HAT培养基，从第7d开始，每天弃掉一半的培养基再补加HT培养基，观察细胞集落的大小，当其达到培养孔面积二分之一时，可进行病毒中和试验检测。在病毒中和试验检测的前一天，将孔内所有培养基吸出，补加HT培养基。在病毒中和试验过程中，取杂交瘤细胞上清液每孔50 μ L与固定好的病毒液充分混合，每个融合成功的孔只需取样一次。用排枪向96孔微量培养板内加入100 μ L BHK-21细胞悬液，放置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养，观察2-3d后，标记未发生细胞病变的孔，则其对应的原始杂交瘤细胞上清，初步可判定为中和抗体。为了保证抗体阳性率，需要将初定孔细胞进行连续两次传代并充分换液，若第二次病毒中和试验检测为阳性，即可对杂交瘤细胞株进行亚克隆。

3.2.10 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

用有限稀释法对筛选得到的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆，亚克隆前一天先制备饲养细胞，将饲养细胞提前铺至96孔微量培养板，150 μ L/孔。将需要亚克隆的杂交瘤细胞从96孔板培养孔内重悬，吸取至一洁净的1.5mL离心管内，细胞计数，按10倍比稀释的原则，逐步稀释至10 cells/mL。将此浓度的细胞悬液接于制备的含饲养细胞的96孔板内，每孔加100 μ L，即每孔理论上有一个杂交瘤细胞。待亚克隆第5d，观察每孔杂交瘤细胞的生长状态，着重标记好具有单集落的培养孔。待亚克隆第7-10d，杂交瘤细胞长至约1/4-1/3培养孔面积时，用

病毒中和试验方法进行检测。挑选有中和效果且为单集落形成的孔内杂交瘤细胞，按同样方法进行亚克隆，重复 3 次，待各株杂交瘤细胞阳性率达到 100%时，即可建株。

3.2.11 单克隆抗体的 IFA 验证

将 BHK-21 细胞接种至 96 孔细胞培养板，待细胞长至 70%-80%时，按 MOI=0.01 接种 SVV-LNSY01-2017 病毒液，同时设不接毒细胞作为阴性对照，于 37°C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 10h。

弃掉旧培养基，用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次。加入固定液(甲醇:丙酮=1:1) 100μL/孔，于-20°C固定 30min。

用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次。加入含 2% BSA 的 PBS 缓冲液 150μL/孔，于 37°C恒温培养箱封闭 1h。

用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次。然后将阳性杂交瘤细胞上清作为一抗，于 37°C恒温培养箱孵育 1h。

用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次。避光加入 Cy3 Goat Anti-Mouse IgG 抗体 (1:2000)，100μL/孔，37°C恒温培养箱孵育 1h。

用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次，最后在倒置荧光显微镜下观察红色荧光及拍照存档。

3.2.12 单克隆抗体的亚型鉴定

使用北京博奥龙生物技术有限公司单抗亚型鉴定试剂盒做检测，具体方法如下：

首先将单克隆抗体特异结合的对应抗原用 CBS 缓冲液稀释至最佳包被浓度包被酶标微孔板，每孔 100μl，置 37°C温育 2 小时，随后用 PBST 洗 3 次，每次 5min。

将待测杂交瘤细胞培养上清每种加 8 孔每孔 100μL，置 37°C温育 30min，而后用 PBST 洗 3 次，每次 5min。

将 8 种酶标记物每种加 1 孔，每孔 100ul，共 8 孔，置 37°C温育 30min 后继续用 PBST 洗 3 次，每次 5min。

随后加 TMB 显色液 37°C避光显色 20min 即可判定结果。肉眼观察兰色孔即为阳性，参看此孔对应的酶标二抗即该单抗的 Ig 类别。

3.2.13 腹水的制备及纯化

选取 8-10 周龄的雄性 BALB/c 小鼠，腹腔注射 0.5mL 弗氏不完全佐剂进行刺激，5-7d 后收集扩大培养的阳性杂交瘤细胞 (10^5 - 10^6 cells) 注射到小鼠腹腔内，7-10d 后待小鼠腹腔极度肿胀时无菌抽取腹水。

ProteinA/G 亲和层析法纯化腹水：

将 2.5mL 购自 GE 公司的 Protein G sepharose 4 fast flow 填料装入 10mL 亲和层析柱，按照其说明书进行腹水的纯化。

腹水 4°C 8000r/min 离心 10min 取上清液，用结合缓冲液稀释 2-3 倍；

平衡亲和柱：以 5 倍柱体积结合缓冲液平衡亲和柱；

上样：将处理过的抗体以 1mL/min 的流速上样；

除杂：用倍柱体积结合缓冲液进行除杂；

洗脱：以 1 倍柱体积的柠檬酸钠缓冲液 (pH=4.0) 进行抗体洗脱，用中和缓冲液调整 pH 至中性 (所有溶液过柱前必须通过 0.45 μ m 滤器过滤)。

3.2.14 杂交瘤细胞染色体计数

取 24 孔细胞板培养的杂交瘤细胞，待生长至对数期时加入终浓度为 0.04 μ g/mL 的秋水仙素，37°C、5%CO₂ 温箱培养 3h。同时，SP2/0 细胞以相同处理作为对照。

倾出秋水仙素处理液，加入 RPMI-1640 基础培养液后将细胞吹起，1000r/min 离心 10min 收集细胞沉淀。

将细胞沉淀用 1mL 37°C 预温的 0.075 mol/L 的 KCl 低渗溶液悬浮，混匀后置 37°C 温育 35 min。

加入 1mL 新配制的固定液 (甲醇:冰乙酸=3:1)，混匀，1000r/min 离心 10min，弃上清液。再加入 1mL 固定液，轻轻混匀，静置 30min，1000r/min 离心 10min，弃上清液。

用适量固定液重悬细胞，吸取一滴细胞悬液于 4°C 预冷的干净载玻片上，轻吹液滴，使细胞悬液铺展于玻片上，室温下自然干燥。

用 10% Giemsa 染液染 15min，流水冲洗，自然干燥。

将载玻片置显微镜油镜下观察计数。

3.2.15 中和单抗识别 SVV 蛋白的鉴定

为了鉴定所制备中和单抗识别 SVV 的主要蛋白，对 SVV-LNSY01-2017 株的结构蛋白利用真核表达系统进行重组表达，利用 Western-blot 确定其识别的蛋白。按如下叙述的步骤进行：

3.2.15.1 病毒 RNA 的提取

取 200 μ L 病毒分离液加入 1.5mL 离心管内，每管加入 1mL TRIzol Reagent，颠倒混匀后室温静置 10min；每管加入 200 μ L 氯仿，漩涡震荡 15s，室温静置 15min；4 $^{\circ}$ C 12000r/min，离心 15min，转移上清液至新的 1.5mL 无 RNA 酶离心管中，加入等体积的异丙醇下上颠倒混匀，室温静置 10min；4 $^{\circ}$ C 12000r/min，离心 15min，弃上清液加入 1mL 预冷的 75%乙醇（DEPC 水配制），上下颠倒混匀；4 $^{\circ}$ C 8000r/min，离心 5min，弃上清液并吸弃管底液体，风干 5min，加入 30 μ L DEPC 水溶解，-80 $^{\circ}$ C 保存。

3.2.15.2 cDNA 的合成

在测定 RNA 浓度后，取 500ng RNA 进行反转录。反转录反应体系入表 3-4：

表 3-4 反转录反应体系

Table 3-4 Reverse transcription reaction system

试剂名称	使用量
RNA 模板	500ng
HiScriptIIQ RT SrperMix	2 μ L
Rnase Free H ₂ O	补加至终体积 10 μ L

反转录的反应条件为 50 $^{\circ}$ C/15min，85 $^{\circ}$ C/2min，4 $^{\circ}$ C/10min，反转录产物即 cDNA，放置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

3.2.15.3 引物设计

根据 SVV-LNSY01-2017 株 VP1、VP2 和 VP3 片段的基因序列通过引物设计软件 Primer5 设计 3 对引物（表 3-5），并在设计好的核酸序列的上下游引物中加入限制性核酸内切酶 EcoRI 和 XhoI 的酶切位点，引物由武汉生工生物技术有限公司合成。

表 3-5 SVV-LNSY01-2017 结构蛋白基因扩增引物

Table 3-5 Primers used in the structural protein gene of SVV-LNSY01-2017

引物名称	引物序列 (5'-3')	酶切位点
VP1-F	GTTCCAGATTACGCTGAATTCTCCACCGACAACGCCGAGAC	EcoRI
VP1-R	ATTAAGATCTGCTAGCTCGAGTTGCATCAGCATCTTCTGC	XhoI
VP2-F	GTTCCAGATTACGCTGAATTTCGATCACAATACCGAAGAAA	EcoRI
VP2-R	ATTAAGATCTGCTAGCTCGAGCTGTTCTCGTCCGTCCC	XhoI
VP3-F	GTTCCAGATTACGCTGAATTTCGGGCCTATTCCCACAGCAC	EcoRI
VP3-R	ATTAAGATCTGCTAGCTCGAGGTGGAACACGTAGGAAGGAT	XhoI

3. 2. 15. 4 PCR 扩增

以反转录的 cDNA 为模板，利用设计的引物进行 VP1、VP2 和 VP3 三个结构蛋白基因的 PCR 扩增。其 PCR 体系配制如表 3-6 所示：

表 3-6 SVV-LNSY01-2017 结构蛋白 PCR 扩增体系

Table 3-6 PCR amplification system for structural protein of SVV-LNSY01-2017

试剂组分	使用量
模板	0.5 μ g
Forward primer	1 μ L
Reverse primer	1 μ L
2 \times Premix Ex Taq	25 μ L
ddH ₂ O	up to 50 μ L

PCR 扩增条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min；95 $^{\circ}$ C 变性 15s，63 $^{\circ}$ C 退火 15s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min；PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

3. 2. 15. 5 PCR 产物的回收

琼脂糖凝胶电泳鉴定基因片段正确以后进行胶回收。

将切下的回收胶置于 2mL 的离心管中，加入 3 倍体积的溶胶液 Buffer PN，56 $^{\circ}$ C 水浴 10min，使凝胶完全溶解；水浴的同时，往吸附柱 CA2 中加入平衡液 Buffer BL 500 μ L，12000r/min 离心 1min，弃废液；待凝胶完全溶解后全部加入吸附柱上柱，室温静置 2min 后，12000r/min 离心 1min，弃废液；加入漂洗液 Buffer PW（用之前加入 200 μ L 的无水乙醇）600 μ L，12000r/min 离心 1min，弃废液，重复此步骤一次；12000r/min 空管离心 2min，然后将吸附柱转入一个新的 1.5mL 离心管中，开盖，置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中，挥发乙醇，晾干；悬空向吸附柱

滤膜上添加 ddH₂O 50 μ L，室温静置 2min，使 ddH₂O 完全浸润吸附膜。然后 12000r/min 离心 2min（为了使洗脱完全，可将离心后收集的洗脱液再次悬空加到吸附柱 12000r/min 离心 2min）。

3. 2. 15. 6 目的基因与 pCAGGS/HA 载体连接

分别将目的基因 VP1、VP2 和 VP3 以及真核表达载体 pCAGGS/HA 通过限制性核酸内切酶 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切，通过琼脂糖凝胶电泳切胶回收后，使用 T4 连接酶对目的基因和载体连接。连接体系如表 3-7 所示。

表 3-7 目的基因与 pCAGGS/HA 的连接体系

Table 3-7 Reaction system of connecting target gene with pCAGGS/HA

试剂	使用量
T4 DNA Ligase	1 μ L
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
pCAGGS/HA 载体	3 μ L
目的基因	14 μ L

将上述反应体系混匀低速离心后，放 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。

3. 2. 15. 7 连接产物的转化

取 -80 $^{\circ}$ C 保存的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 100 μ L，待冰上融化后加入 10 μ L 连接产物，轻轻混匀后冰浴 30min；放入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 90s；随后放于冰上 5min；向每管加入 400 μ L 无抗生素的 LB 培养基，37 $^{\circ}$ C 摇床摇动 50min (180r/min)；取 200 μ L 菌液涂布于含载体对应抗生素的琼脂平板上，平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中，培养至出现肉眼可见的单个单菌落，此过程一般需要 10-15h。

3. 2. 15. 8 菌液 PCR 鉴定重组质粒

每个平板随机挑取若干单菌落溶解于 10 μ L 无菌水中，取 2 μ L 作为模板，使用表 3-5 中的上下游引物，利用 2 \times Taq Master Mix 酶进行 PCR 鉴定。反应体系 10-20 μ L，PCR 鉴定程序同上述 PCR 扩增程序。

3. 2. 15. 9 提取重组质粒

将 PCR 鉴定正确的菌液转移至灭菌的细菌瓶中，每个细菌瓶加入 5mL LB 培养基，并加入相应抗生素；做好标记后于 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 10h (180r/min)；菌液倒入 2mL 离心管内，12000r/min 离心 1min 收集菌体，重复一次。向离心管中加入 250 μ L Solution I，重悬菌体；加入 250 μ L Solution II，上下轻轻颠倒 8 次，

此时开盖有拉丝现象；加入 350 μ L SolutionIII，上下轻轻颠倒 8 次，出现白色絮状物；12000r/min 离心 15min，将上清吸取到吸附柱中，12000r/min 离心 1min；弃去收集管内废液，向吸附柱中加入 500 μ L 的 HBC Buffer，12000r/min 离心 1min；弃去收集管内废液，向吸附柱中加入 700 μ L DNA Washing Buffer，12000r/min 离心 1min，并重复一次；空管 12000r/min 离心 2min，随后弃去收集管，将吸附柱转移至 1.5mL 离心管中，37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 5min；悬空向学习辅助滤膜上加入 50 μ L ddH₂O，12000r/min 离心 2min，离心结束后弃去吸附柱，合上离心管盖并测定质粒浓度做好标记放于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.2.15.10 重组质粒双酶切及测序鉴定

取质粒 1 μ L，用限制性内切酶及其相应 Buffer，在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内酶切 1h，酶切体系参考所使用的限制性内切酶说明书。取 10 μ L 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，初步鉴定质粒构建成功与否，选取酶切鉴定正确的质粒送往武汉生工生物技术有限公司测序，选取测序结果于原始序列碱基符合率 100% 的质粒冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

3.2.15.11 瞬时转染

本研究中使用脂质体 2000（Lipofectamine 2000）介导的转染法。具体操作步骤如下所述：

细胞的接种：培养 293T 细胞，细胞长至铺满六孔板底壁 80% 左右，进行转染试验；

转染复合物的准备：以转染六孔板细胞为例，准备两个 1.5mL EP 管，分别记作 A 和 B。A、B 中分别加入 100 μ L OPTI-MEM，继而 A 中加入质粒 DNA，B 中加入 Lipofectamine 2000（DNA（ μ g）：Lipofectamine 2000（ μ L）为 1:2），用枪头轻轻混匀，室温静置 5~10 min。静置结束后将 B 液转移至 A 中，用枪头轻轻混匀，室温静置 15~20 min；

细胞感作：吸弃细胞培养液，加入 1mL OPTI-MEM/孔，将 A 中的转染复合物加入细胞中，轻轻混匀，继续培养 6h。6h 后吸弃转染液，更换新鲜的完全培养液继续培养。

3.2.15.12 蛋白质免疫印记

按照转染步骤将测序正确的重组质粒转染至 293T 细胞中，待转染 30h 后，

收取细胞样品，每份样品用 80 μ L 含有蛋白酶抑制剂的 NP40 细胞裂解液冰上作用裂解细胞 20~30 min。裂解结束，12000 r/min，4 $^{\circ}$ C 离心 10min 收集上清液。从上清中取出 50 μ L 进行全细胞裂解液蛋白检测。按照总体的 1/2 加入 2 \times SDS-PAGE Loading Buffer 并混匀，按照步骤进行 SDS-PAGE 电泳，每孔上样 20 μ L，以 pCAGGS/HA 空载体表达产物为空白对照，分别以 GST-Tag（1: 5000）和中和单抗细胞培养上清（1: 5）为一抗，HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗（1: 5000），利用 BIORAD 照膜成像系统，进行 Western-blot 鉴定各中和抗体所识别的蛋白。

3.2.16 抗原表位鉴定方案及引物设计

SVV-VP2 蛋白全长为 284 个氨基酸，将之分成包含最长表位的长度且部分重叠的 8 个截短片段，确保分成的片段对 VP2 蛋白的表位无影响，并利用生物学软件 Primer5 设计引物（表 3-8），并且在上下游引物中设置限制性核酸内切酶 BamHI 和 XhoI 的酶切位点，引物由武汉生工生物技术有限公司合成。

表 3-8 SVV-LNSY01-2017 VP2 的截短表达引物序列

Table 3-8 Primers used for truncation expression of SVV-LNSY01-2017 VP2

引物名称	引物序列 5'-3'	VP2 上的位置 (aa)	大小 (bp)
V1-F	CTGGTTCGCGTGGATCCGATCACAATACCGAAGAAATGG	1-110	330
V1-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTAAGAAATGTCTATGTGGGGTA		
V2-F	CTGGTTCGCGTGGATCCTTCACGGCTACCCTACATAGAC	100-200	300
V2-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTGTTACTTGATAGGGGTTAATG		
V3-F	CTGGTTCGCGTGGATCCGGCCCCAATTCATTAACCCCT	190-284	282
V3-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCTCGTCCGTCCCGGTC		
V4-F	CTGGTTCGCGTGGATCCTTCACGGCTACCCTACATAGAC	100-138	114
V4-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTTCGGGGACCATGGCAACAAG		
V5-F	CTGGTTCGCGTGGATCCGGCGCTCTTCTTGTTGCCATG	129-166	114
V5-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGATCGTCAGACATTTCCACCCAC		
V6-F	CTGGTTCGCGTGGATCCGAAGAGCAGTGGGTGGAAATG	157-200	132
V6-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTGTTACTTGATAGGGGTTAATG		
V7-F	CTGGTTCGCGTGGATCCTTCACGGCTACCCTACATAGAC	100-153	159
V7-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTTGTAAGCTCTTGCCTTGCCG		

续表

引物名称	引物序列 5'-3'	VP2 上的位置 (aa)	大小 (bp)
V8-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGTC AACCTGACGGCAAGGC	143-200	174
V8-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTGTTACTTGATAGGGGTTAATG		
P1-F	CTGGTCCGCGTGGATCCAAGGCAAAGAGCTTACAAGAG	148-284	441
P1-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCGTCCCGGTC		
P2-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGAGCTGAATGAAGAGCAGTGGG	154-284	393
P2-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCGTCCCGGTC		
P3-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGATCACAATACCGAAGAAATGG	1-159	477
P3-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGCTCTTCATTCAGCTCTTG		
P4-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGATCACAATACCGAAGAAATGG	1-155	465
P4-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCAGCTCTTGTAAGCTCTTTGCC		
P5-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGATCACAATACCGAAGAAATGG	1-157	471
P5-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGTTCATTCAGCTCTTGTAAGCTCT TTGCC		
P6-F	CTGGTCCGCGTGGATCCAAGAGCTTACAAGAGCTGAATG	150-284	405
P6-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCGTCCCGGTC		
P7-F	CTGGTCCGCGTGGATCCTTACAAGAGCTGAATGAAGAGC	152-284	399
P7-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCGTCCCGGTC		
P8-F	CTGGTCCGCGTGGATCCCAAGAGCTGAATGAAGAGCAG	153-284	396
P8-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCGTCCCGGTC		
P9-F	CTGGTCCGCGTGGATCCGATCACAATACCGAAGAAATGG	1-158	474
P9-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTCTTCATTCAGCTCTTGTAAGC TC		
JD-F	ATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTG	鉴定空载体长	
JD-R	TCAAGAATTATACACTCCGCTATCGC	516bp	

3.2.17 Western-blot 初步鉴定中和表位

按照 PCR 扩增体系, 以 pCAGGS/HA-VP2 为模板, PCR 扩增 V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7 和 V8 片段。之后按照前述步骤, 将截短片段连接至 pGEX-KG 载体上, 随后将成功构建的重组质粒转化至大肠杆菌 BL (DE3) 中, 均匀涂布于已制备好的含 Amp^r 的 LB 平板, 置于 37°C 培养箱倒置培养 12h。无菌挑取单

菌落接种于 5mL 含 Amp⁺ 抗生素的 LB 液体培养基中，置于 37°C、180 r/min 摇床培养过夜，将过夜培养的菌液按 1:100 比例加入含有 Amp⁺ 抗生素的 LB 液体培养基中，置于 37°C、180 r/min 摇床培养 3h 左右至 OD_{600nm} 值在 0.5-0.6 之间，加 IPTG 使其终浓度为 0.1mmol/L，37°C、180 r/min 诱导 3h。诱导结束后，收集菌体，对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳，以 pGEX-KG 空载体的诱导表达产物为空白对照，分别以 GST-Tag 检测抗体（1: 5000）和中和单抗细胞培养上清（1: 5）为一抗，HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗（1: 5000），利用 BIORAD 照膜成像系统，进行 Western-blot 鉴定各中和抗体所识别的表位。

3.2.18 中和单抗识别抗原表位的精确定位

为了进一步鉴定实验制备的单抗所针对的抗原表位，根据 Western-blot 初次鉴定出该中和抗体识别的表位区域，进一步把上述片段重叠的区域分为 9 段重叠截短片段（P1-P9），重复上述步骤，利用 Western-blot 进一步鉴定中和抗体识别的片段区域，共合成 9 对相互重叠的互补核苷酸序列（见表 3-8）。取合成的引物稀释至 10pmol，上下游引物各取 10 μ L 于 PCR 管中混匀后置 PCR 仪中设置成 95°C，5min 待其温度降至室温。将直接退火合成寡核苷酸片段直接与酶切后的载体进行连接。其余步骤同上，直至利用 Western-blot 鉴定出中和抗体能够识别的最小片段为止。

3.2.19 中和表位的序列比对

从 Gen Bank 上下载 26 株国内外 SVV 分离株 VP2 基因的氨基酸序列（表 3-9），根据该 mAb 所识别的抗原表位，利用生物学软件 DNASTAR 对其识别的相应区域进行氨基酸序列比对分析。

表 3-9 SVV 参考毒株信息

Table 3-9 Information of SVV reference strain

GenenBank ID	GenenBank NO.	国家地区
CH-01-2015	KT321458.1	中国广东
CH-02-2015	KX173339.1	中国广东
CH-03-2015	KX173338.1	中国广东
CH-04-2015	KX193340.1	中国广东
CH-DB-11-2015	KX751943.1	中国广东
CH-DL-11-2016	KX751944.1	中国广东
CH-LX-01-2016	KX751945.1	中国广东
CH-ZW-01-2016	KX751946.1	中国广东
CH-FJ-2017	KY747510.1	中国福建
CH-GXI09-2016	KY038016.1	中国广西
CH-HN-2017	KY747511.1	中国河南
CH-HNSL-2017	KY747512.1	中国河南
SVA-HLJ-CHA-2016	KY419132.1	中国黑龙江
HB-CH-2016	KX377924.1	中国湖北
SVV-HN16	MF893200.1	中国河南
SVV-001	DQ641257.1	美国
Colombia-2016	KX857728.1	哥伦比亚
G103_SV_1-2016-Thailand	KY368743.1	泰国
G103_SV_2-2016-Thailand	KY368744.1	泰国
MN15-84-8	KU359211.1	美国
SVA-BRA-GO3-2015	KR063109.1	巴西
SVA-BRA-MG1-2015	KR063107.1	巴西
SVA-canada-MB-NCFAD-104-1-2015	KY486156.1	加拿大
SVA-canada-ON-FMA-2015-0024T2-2015	KY486166.1	加拿大
SVA-OH1	KU058182.1	美国
US-15-21901SD	KU051394.1	美国

3.2.20 关键性氨基酸位点鉴定

3.2.20.1 单点突变引物设计

将鉴定出中和表位的每个氨基酸依次单独突变为丙氨酸（Alanine, A），并设计 VP2 单点突变后的上下游片段 PCR 扩增引物，引物如下表所示：

表 3-10 单点突变引物设计

Table 3-10 Design the single point mutation primers

引物名称	引物序列 5'-3'	扩增片段
VP2-F	CTGGTTCCGCGTGGATCCGATCACAATACCG AAGAAATGG	VP2 原始片段
VP2-R	ATTAAGCTTGAGCTCGAGCTGTTCCCTCGTCCG TCCCGGTC	
VP2-Q153A-R	TTCATTCAGCTCTGCTAAGCTCTTTGCC	VP2-Q153A 上游片段
VP2-Q153A-F	GCAAAGAGCTTAGCAGAGCTGAATGAAGAG	VP2-Q153A 下游片段
VP2-E154A-R	CTCTTCATTCAGTGTGTAAGCTCTTTG	VP2-E154A 上游片段
VP2-E154A-F	AAGAGCTTACAAGCACTGAATGAAGAGC	VP2-E154A 下游片段
VP2-L155A-R	CTGCTCTTCATTGCTCTTGTAAGCTC	VP2-L155A 上游片段
VP2-L155A-F	AGCTTACAAGAGGCAAATGAAGAGCAGTG	VP2-L155A 下游片段
VP2-N156A-R	CCACTGCTCTTCTGCCAGCTCTTGTAAG	VP2-N156A 上游片段
VP2-N156A-F	TTACAAGAGCTGGCAGAAGAGCAGTGG	VP2-N156A 下游片段
VP2-E157A-R	CACCCACTGCTCTGCATTCAGCTCTTG	VP2-E157A 上游片段
VP2-E157A-F	CAAGAGCTGAATGCAGAGCAGTGGGTG	VP2-E157A 下游片段
VP2-E158A-R	TTCCACCCACTGTGCTTCATTCAGCTC	VP2-E158A 上游片段
VP2-E158A-F	GAGCTGAATGAAGCACAGTGGGTGGAAAT	VP2-E158A 下游片段

3.2.20.2 扩增单点突变基因

以 SVV cDNA 为模板，按照 3.2.14 所述 PCR 扩增方法，将点突变基因上下游片段依次进行 PCR 扩增，通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收正确基因片段，并将上下游片段同时加入作为模板，进行融合 PCR 扩增单点突变基因。

3.2.21 关键性氨基酸位点的 Western-blot 验证

将单点突变基因与 pCAGGS/HA 载体连接，并按照前述方法构建重组质粒。将正确的重组质粒转染至 293T 细胞中，收获重组蛋白后按照前述同样的步骤进行 SDS-PAGE 电泳，每孔上样 20 μ L，以 pCAGGS/HA 空载体表达产物为空白对照，pCAGGS/HA-VP2 表达产物为阳性对照，分别以 HA-Tag（1: 5000）和中和

单抗细胞培养上清（1：5）为一抗，HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗（1：5000），利用 BIORAD 照膜成像系统，进行 Western-blot 鉴定出中和表位的关键性氨基酸点。

4 结果分析

4.1 病毒培养与纯化

4.1.1 摸索病毒扩增条件

为了获得大量病毒,前期工作主要探索了 SVV-LNSY01-2017 病毒在 BHK-21 细胞中的最佳感染量。一般来说,正常的 BHK-21 细胞最长存活时间是 4 天,分别以感染量为 1.0MOI 至 0.01MOI 的病毒接种 BHK-21 细胞,通过逐日观察,确定了病毒最佳感染剂量为 0.01MOI,最佳收毒时间为 60h。

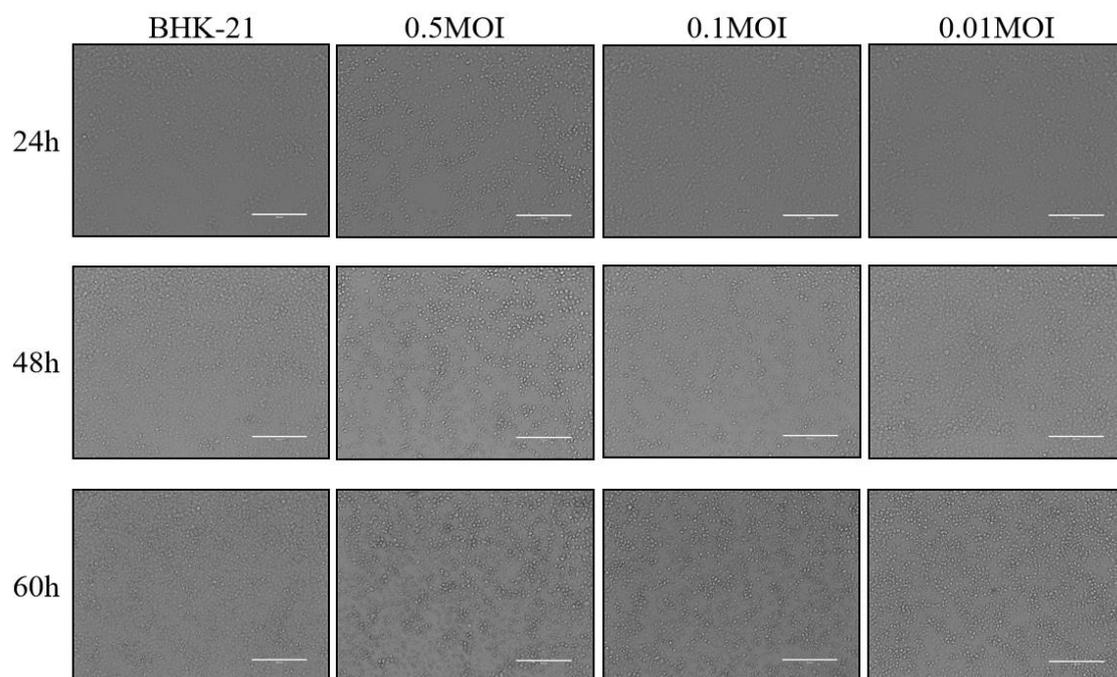


图 4-1 摸索 SVV-LNSY01-2017 病毒最佳感染剂量

Fig. 4-1 Summarizing the optimal infection dose of SVV-LNSY01-2017 virus

4.1.2 超离纯化病毒

依据上述扩毒条件,在 175cm² 的细胞培养瓶中,将 SVV-LNSY01-2017 病毒液以 0.01MOI 的感染量接种于 BHK-21 细胞中,连续观察细胞病变情况约 60h,细胞病变程度达到预期效果则收获病毒液。超离纯化结果显示 50%-65%蔗糖层之间有一条肉眼可见的病毒带(图 4-2)。使用 SDS-PAGE 蛋白胶对病毒超高速离心过程中各个组分进行检测,结果显示 50%-65%蔗糖层之间的病毒带可以检测出 4 条蛋白,大小从上至下分别是 39KDa、37KDa、34KDa 和 11KDa,与 SVV-LNSY01-2017 病毒结构蛋白 VP2、VP1、VP3 和 VP4 大小一致(图 4-3)。

经兔源 VP1 多抗进行 Western-blot 鉴定，结果显示检测到一条特异性条带，大小约为 37KDa，与 SVV VP1 蛋白大小相符（图 4-4）。

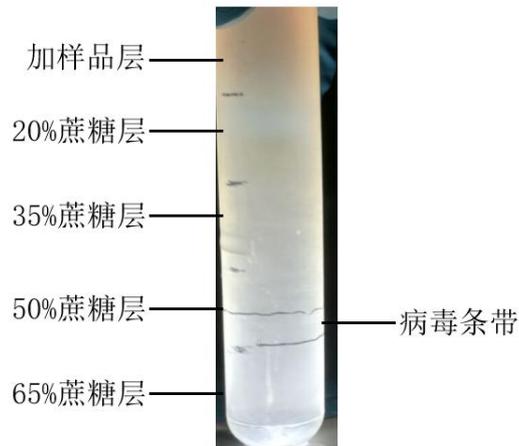


图 4-2 蔗糖密度梯度离心

Fig. 4-2 Sucrose Density Gradient Centrifugation

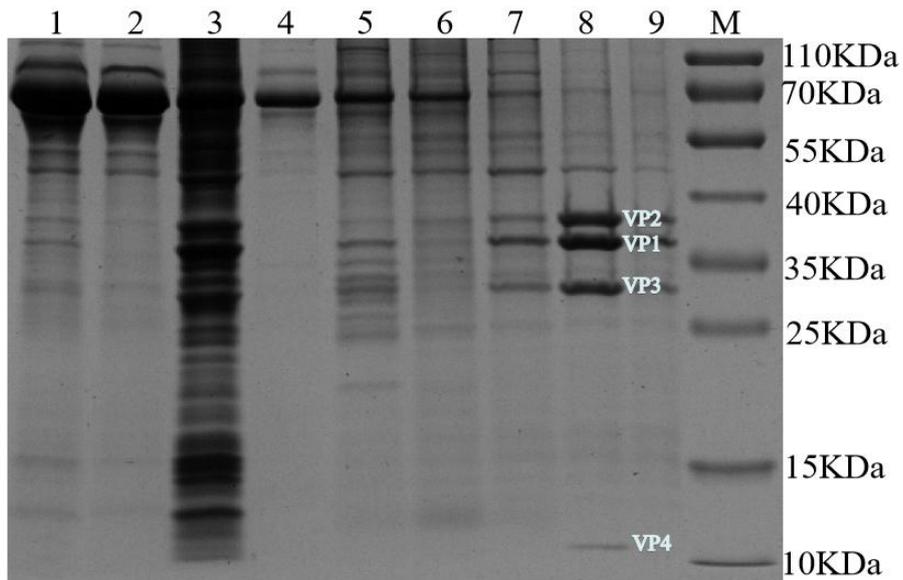


图 4-3 SDS-PAGE 检测纯化 SVV 病毒过程中各组分成分

Fig. 4-3 The SDS-PAGE detection of sucrose density gradient centrifuged of SVV

M: 蛋白 Marker; 1. 病毒液去细胞碎片; 2. 浓缩上层; 3. 浓缩下层;

4. 加样品层; 5. 20%蔗糖层; 6. 35%蔗糖层; 7. 50%蔗糖层; 8.病毒条带层; 9. 65%蔗糖层

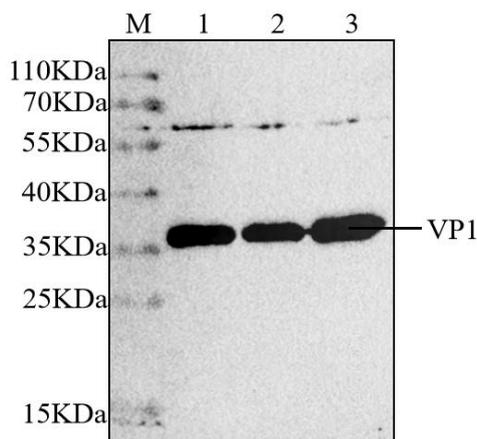


图 4-4 SVV 病毒蔗糖密度梯度离心后 Western-blot 检测

Fig. 4-4 The Western-blot detection of sucrose density gradient centrifuged of SVV

M: 蛋白 Marker; 1.2.3. 纯化的病毒

4.1.3 纯化病毒的活性鉴定

将纯化的病毒感染 BHK-21 细胞，使用兔源 VP1 多抗作为一抗做 IFA 鉴定，结果显示感染了纯化病毒 SVV-LNSY01-2017 的细胞可见特异性红色荧光，而 BHK-21 空白对照组没有荧光，表明纯化后的病毒在细胞内具有感染活性（图 4-5）。随后测定病毒毒价为 1×10^{10} TCID₅₀，通过 BCA 法测得病毒浓度为 1mg/mL。

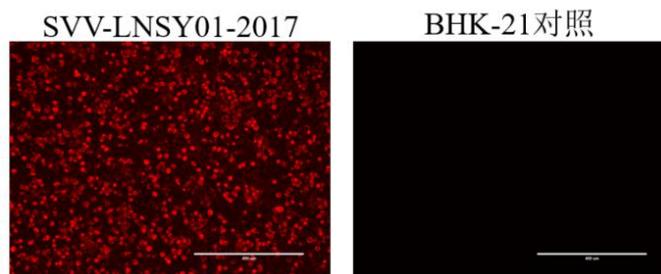


图 4-5 纯化病毒的 IFA 检测

Fig. 4-5 IFA detection of purified virus

4.2 制备单克隆抗体

4.2.1 抗原最佳包被浓度测定

将纯化的 SVV-LNSY01-2017 病毒液从浓度 4 μ g/mL 依次二倍倍比稀释至浓度 0.0625 μ g/mL，一共七个稀释度，使用包被液（CBS，pH=9.6）4 $^{\circ}$ C 过夜包被 96 孔酶标板。将小鼠血清从 1:100 倍比稀释至 1:12800 并依序加入酶标板内。通过间接 ELISA 方法，底物显色后读取 OD_{630nm} 值。若小鼠血清稀释倍数在 1:12800

时，OD_{630nm} 值大于等于 1.0，则纵向抗原浓度为最佳包被浓度。结果表明，SVV-LNSY01-2017 病毒颗粒的最佳包被浓度为 1 μ g/mL（表 4-1）。

表 4-1 方阵滴定法确定的最佳包被浓度

Table 4-1 Determine the Best Concentration of antigen by Square Titration

血清稀释倍数		抗原稀释度 (μ g/mL)						
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
1: 100	+	2.907	2.817	2.680	2.693	2.268	1.698	1.075
	-	0.141	0.079	0.064	0.055	0.055	0.052	0.049
1: 200	+	2.987	2.871	2.695	2.390	1.968	1.507	0.935
	-	0.078	0.057	0.050	0.046	0.048	0.045	0.047
1: 400	+	3.319	2.819	2.649	2.385	1.919	1.309	0.775
	-	0.066	0.048	0.044	0.052	0.044	0.051	0.069
1: 800	+	3.036	2.842	2.540	2.095	0.141	0.776	0.435
	-	0.051	0.048	0.042	0.039	0.039	0.041	0.041
1: 1600	+	3.058	2.724	2.193	1.674	1.137	0.754	0.404
	-	0.046	0.043	0.047	0.043	0.040	0.040	0.045
1: 3200	+	2.961	2.562	2.006	1.316	0.768	0.458	0.246
	-	0.043	0.042	0.044	0.041	0.041	0.044	0.041
1: 6400	+	2.881	2.328	1.727	1.033	0.591	0.362	0.198
	-	0.046	0.039	0.039	0.046	0.041	0.039	0.039
1: 12800	+	2.876	2.046	1.006	0.719	0.342	0.218	0.136
	-	0.056	0.048	0.044	0.047	0.044	0.044	0.049

a) “+”表示阳性血清 OD_{630nm} 值; b) “-”表示阴性血清 OD_{630nm} 值

4.2.2 免疫鼠血清效价检测

在第三次小鼠免疫后 10 天，将免疫小鼠固定于特制的鼠笼内，通过断尾采血法收集血液 200 μ L，利用上述所测的抗原最佳包被浓度包被 96 孔酶标板，使用间接 ELISA 方法检测阳性血清的效价。下图检测结果证明：免疫了 SVV-LNSY01-2017 纯化病毒的 4 只 BABL/C 小鼠血清效价全都达到了 1:12800，都达到了做细胞融合的要求，而 2 号免疫鼠的血清效价水平相对较高，因此选择 2 号免疫鼠作为细胞融合的首要对象（如图 4-5）。

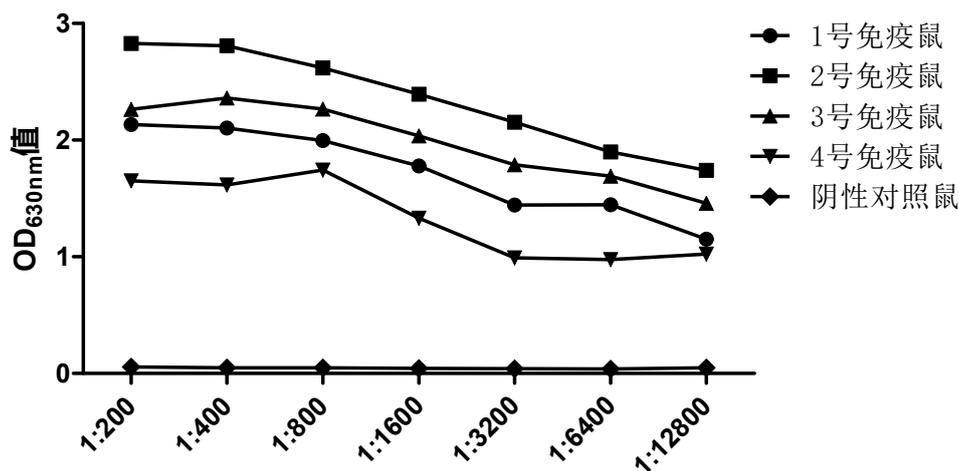


图 4-5 间接 ELISA 检测免疫小鼠的血清效价

Fig. 4-5 The detection of serum titer of immunized mice by indirect ELISA

4.2.3 中和性单克隆抗体细胞株筛选

细胞融合后，逐日观察 96 孔微量培养板内细胞生长情况，对其中含有杂交瘤细胞的孔进行标记，并在细胞铺满孔内三分之一面积时，更换含 2%HT 的 1640 完全培养基，如此可以降低假阳性的概率。提前培养适量的 BHK-21 细胞，以 SVV-LNSY01-2017 (200TCID₅₀) 作为检测病毒进行杂交瘤细胞上清的病毒中和试验检测，连续观察 3 天并统计实验结果。把没有发生细胞病变的孔所对应的杂交瘤细胞暂定为“疑似中和细胞株”。将“疑似中和细胞株”逐步扩大培养后重复细胞上清的病毒中和试验检测，若在 2 次传代后检测，其细胞上清依旧具有中和 SVV-LNSY01-2017 的能力，则可确定其为中和抗体，可保留细胞做下步处理。利用有限稀释法对这些细胞进行连续三次亚克隆，每次所获得的杂交瘤细胞都需要经过病毒中和试验验证，具有中和病毒能力的细胞才能用于下一次克隆化。经过反复的筛选得到了 10 株抗体，分别命名为 2C8、3E4、4C3、5A1、5D4、6D7、6E3、6E5、7C11、7H7。这 10 株杂交瘤细胞的培养上清对 SVV-LNSY01-2017 株和 SVV-HB-2016 株的中和效价如表 4-2 所示。

表 4-2 阳性杂交瘤细胞上清中和效价

Tablet 4-2 The neutralizing titer of positive hybridoma cells

中和效价 (PD ₅₀)	SVV-LNSY01-2017	SVV-HB-2016
2C8	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
3E4	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
4C3	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
5A1	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
5D4	1: 2 ⁷	1: 2 ⁶
6D7	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
6E3	1: 2 ⁶	1: 2 ⁶
6E5	1: 2 ³	1: 2 ²
7C11	1: 2 ³	1: 2 ¹
7H7	1: 2 ⁴	1: 2 ⁴

4.3 细胞培养上清 ELISA 效价测定

通过 ELISA 检测得到 7 株高 ELISA 效价抗体, 分别是 2C8、3E4、4C3、6D7、6E3、6E5、7C11 (图 4-6); 有 3 株低 ELISA 效价抗体, 分别是 5A1、5D4、7H7, 其稀释度在 1: 2 时 630 纳米处的光密度值达到 1.0 (图 4-7)。依照结果可以判定 10 株抗体的 ELISA 效价如表 4-3 所示, 其中 3E4 和 6D7 培养上清效价达到 1: 6400。

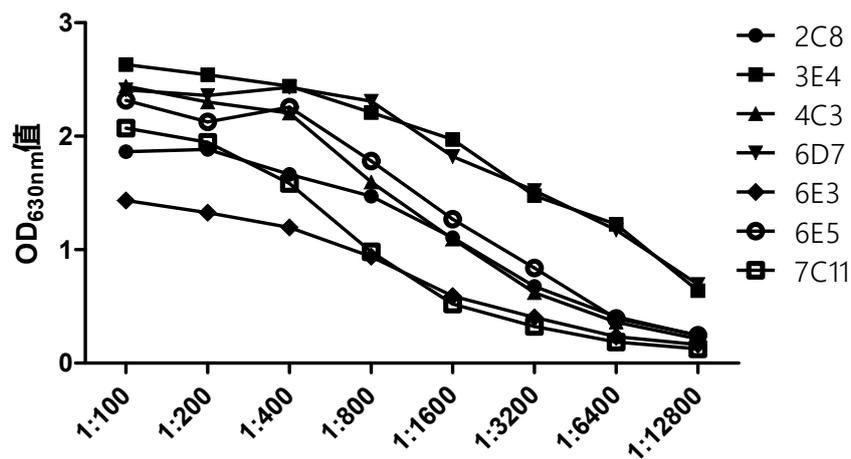


图 4-6 细胞上清 ELISA 效价检测 (高效价)

Fig. 4-6 ELISA titer detection of cell supernatants (High)

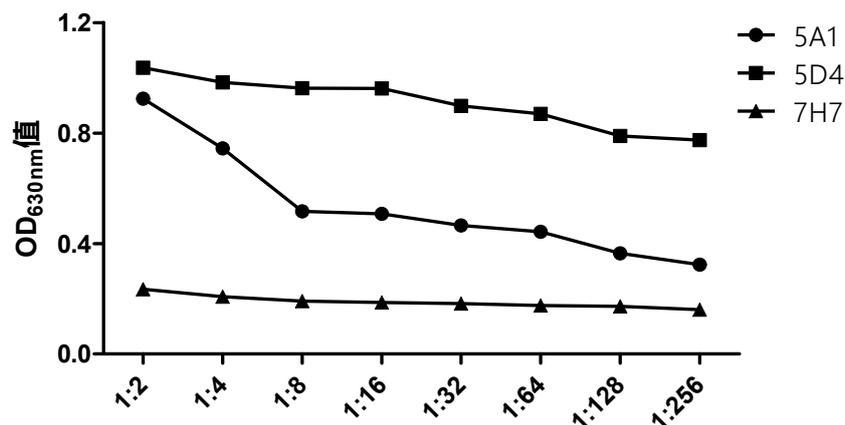


图 4-7 细胞上清 ELISA 效价检测（低效价）

Fig. 4-7 ELISA titer detection of cell supernatants (Low)

表 4-3 细胞上清效价判定

Table 4-3 The determination of cell supernatants

细胞株	细胞上清 ELISA 效价
2C8	1: 1600
3E4	1: 6400
4C3	1: 1600
5A1	1: 2
5D4	1: 4
6D7	1: 6400
6E3	1: 800
6E5	1: 3200
7C11	1: 800
7H7	1: 2

4.4 病毒间接免疫荧光鉴定

在 BHK-21 细胞中感染 SVV-LNSY01-2017 病毒，接毒之后产生明显细胞病变，将 10 株筛选的中和性杂交瘤细胞分泌的抗体作为被检抗体，将红色荧光标记的羊抗小鼠 IgG 作为二抗，做间接免疫荧光试验检测。IFA 结果显示，10 株中和单抗都可以与 SVV-LNSY01-2017 病毒产生特异性结合，图片显示检测到较为明显的红色荧光信号，而以 SP2/0 骨髓瘤细胞培养上清做 IFA 检测的阴性对照未见明显荧光信号，表明该 10 株杂交瘤细胞所分泌的中和抗体与 SVV-LNSY01-2017 病毒的结合都是特异性的（图 4-8）。图中 5A1、5D4 和 7H7

三株单抗的荧光信号较弱，恰恰对应于其低 ELISA 效价。

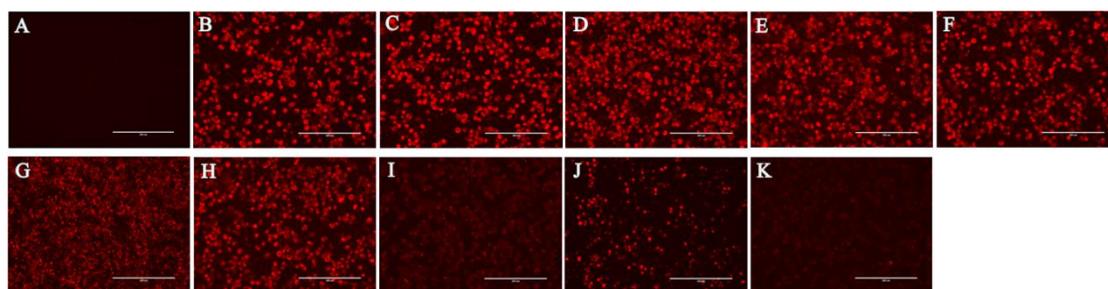


图 4-8 中和单抗与 SVV-LNSY01-2017 在 BHK-21 细胞上的间接免疫荧光分析

Fig. 4-8 The indirect immunofluorescence detection of neutralizing mAbs and SVV-LNSY01-2017 in BHK-21 cell

A: SP2/0; B: 2C8-mAb; C: 3E4-mAb; D: 4C3-mAb; E: 6D7-mAb; F: 6E3-mAb; G: 6E5-mAb; H: 7C11-mAb; I: 5A1-mAb; J: 5D4-mAb; K: 7H7-mAb

4.5 单克隆抗体的亚型测定

使用北京博奥龙免疫技术有限公司单抗亚型试剂盒对 SVV-LNSY01-2017 株中和单抗进行亚型鉴定。结果显示：2C8、3E4、4C3、5A1、5D4、6D7、6E3、6E5、7C11 株单抗亚型均为 IgG/Kappa，7H7 株单抗亚型为 IgA/Kappa，如表 4-4 所示。

表 4-4 单克隆抗体的亚型鉴定

Table 4-4 The identification of Antibody Subtypes of monoclonal antibodies

细胞株	重链	轻链
2C8	IgG2a	Kappa
3E4	IgG2a	Kappa
4C3	IgG2a	Kappa
6D7	IgG2a	Kappa
6E3	IgG2a	Kappa
6E5	IgG2a	Kappa
7C11	IgG2a	Kappa
5A1	IgG2a	Kappa
5D4	IgG2a	Kappa
7H7	IgA	Kappa

4.6 杂交瘤细胞染色体计数

一般情况下，小鼠脾细胞的染色体数目约为 40 对，SP2/0 骨髓瘤细胞约为 60 对。通过对 10 株杂交瘤细胞染色体计数，数目均在 90-100 对之间，被检杂交

瘤细胞是两两融合的细胞，又因这批杂交瘤细胞经过多次传代，表明其遗传性质稳定，在多次传代过程中不会丢失染色体，从而保证了细胞的使用效果（图 4-9）。

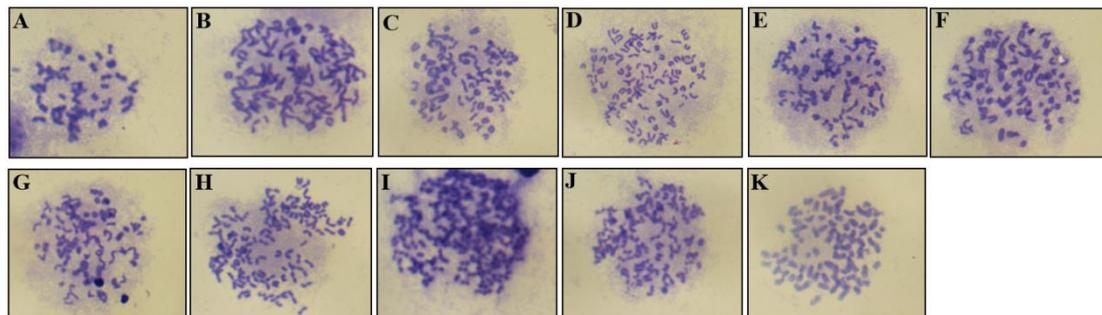


图 4-9 单克隆抗体细胞株的染色体计数

Fig. 4-9 Counting the chromosome of monoclonal antibody cell lines

A: SP2/0 细胞株; B: 2C8 细胞株; C: 3E4 细胞株; D: 4C3 细胞株; E: 6D7 细胞株;

F: 6E3 细胞株; G: 6E5 细胞株; H: 7C11 细胞株; I: 5A1 细胞株; J: 5D4 细胞株; K: 7H7 细胞株

4.7 单抗腹水制备与纯化

将采集得到的小鼠腹水利用 Protein A/G 纯化柱纯化。将纯化后的腹水进行 SDS-PAGE 检测，与实验室已纯化保存的 SVV-2G6 单抗腹水相对比一致，可见 55KDa 的重链和 25KDa 的轻链条带（图 4-10），图中无明显杂带，表明此法获得的抗体纯度较高，抗体中的有效成分占据多数。

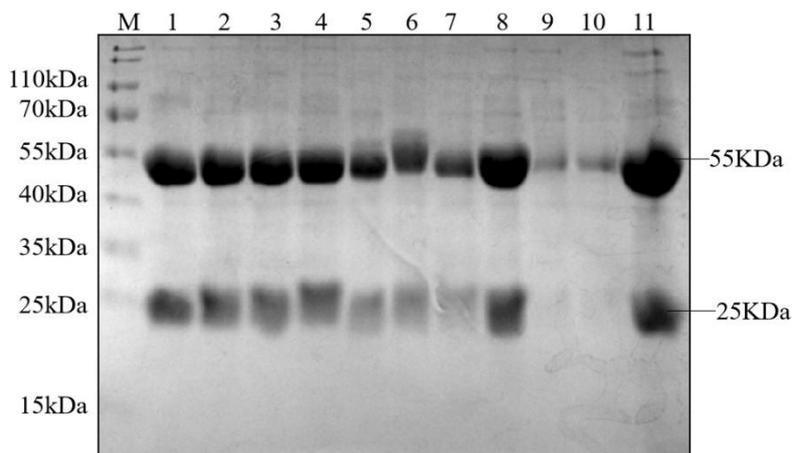


图 4-10 中和单抗腹水的纯化

Fig 4-10 The purification of neutralizing mAbs ascites

M: Protein Marker; 1: 2C8 株单抗腹水; 2: 3E4 株单抗腹水; 3: 4C3 株单抗腹水;
4: 6D7 株单抗腹水; 5: 5A1 株单抗腹水; 6: 5D4 株单抗腹水; 7: 6E3 株单抗腹水;
8: 6E5 株单抗腹水; 9: 7C11 株单抗腹水; 10: 7H7 株单抗腹水; 11: 2G6 株单抗腹水

4.8 纯化腹水的中和活性检测

通过 BCA 方法，将纯化的腹水进行蛋白浓度测定，其浓度分别如表 4-5 所示。随后将腹水进行 SVV-LNSY01-2017 株病毒中和试验检测，结果显示 2C8，3E4 和 5A1 中和效价达到 $1: 2^{10}$ ；4C3，6D7，6E3 和 5D4 中和效价达到 $1: 2^9$ ；6E5 和 7C11 中和效价为 $1: 2^7$ ；7H7 中和效价达到约 $1: 2^5$ （图 4-11）。由此，可以计算得到 10 株抗体处于中和效价时的中和浓度，总体来说 10 株抗体的中和浓度皆处于 $<0.5\text{mg/mL}$ ，其中 5D4 和 6E5 抗体的中和浓度显著偏高，表明其中和能力要稍逊一筹，而其余 8 株抗体中和能力优于 5D4 和 6E5，且中和能力相近。

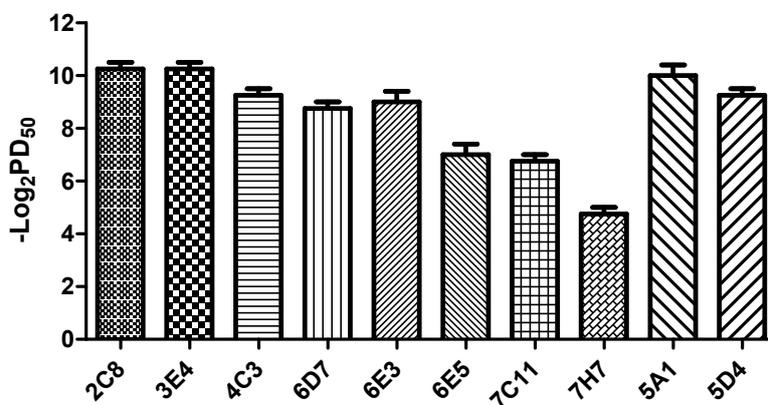


图 4-11 中和抗体纯化腹水中和效价测定

Fig 4-11 Determination the neutralization titer of neutralizing antibody purified ascites

表 4-5 纯化腹水浓度测定

Fig 4-5 Determination the concentration of purified ascites

腹水	浓度 (mg/mL)	中和浓度 (mg/mL)
2C8	0.521	0.005
3E4	0.421	0.004
4C3	0.395	0.008
6D7	0.263	0.005
6E3	0.269	0.005
6E5	0.635	0.496
7C11	0.020	0.001
7H7	0.022	0.007
5A1	0.080	0.003
5D4	1.210	0.236

4.9 中和单抗 Western-blot 分析

4.9.1 构建 SVV 结构蛋白真核表达质粒

以反转录后得到的 SVV-LNSY01-2017 株 cDNA 为模板，分别利用引物对基因片段 VP1、VP2 和 VP3 做 PCR 扩增。VP1、VP2 和 VP3 基因片段的核酸长度分别为 792bp、852bp 和 717bp，核酸电泳检测结果显示目的基因符合预期结果（图 4-12）。

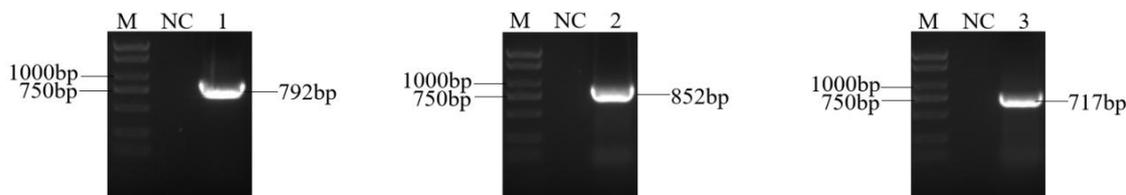


图 4-12 PCR 扩增 VP1、VP2、VP3 基因片段

Fig. 4-12 Amplify the gene fragment of VP1、VP2 and VP3 by PCR

M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control; 1: SVV-VP1; 2: SVV-VP2; 3: SVV-VP3

将上述 PCR 扩增的基因片段分别连接至真核表达质粒载体 pCAGGS/HA 中，连接产物经过大肠杆菌转化与质粒提取获得重组表达质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP1、pCAGGS/HA-SVV-VP2 和 pCAGGS/HA-SVV-VP3。通过 NdeI 和 XhoI 双酶切鉴定重组质粒，利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示分别得到载体和目的基因 2 条片段，大小符合预期（图 4-13）。将酶切正确的质粒送往武汉生工生物技术有限公司进行测序，测序结果显示与原始序列碱基匹配率 100%。酶切鉴定和测序鉴定结果说明重组质粒均成功构建。

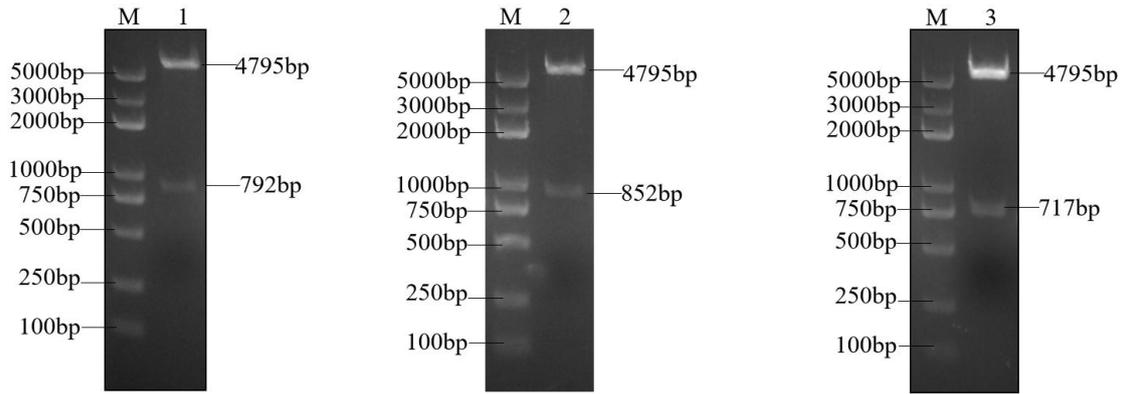


图 4-13 质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP1/VP2/VP3 酶切检测

Fig 4-13 The enzyme detection of plasmid pCAGGS/HA-SVV-VP1/VP2/VP3

M: DL5000 DNA Marker; 1: 质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP1; 2: 质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP2;
3: 质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP3

4.9.2 蛋白质免疫印迹分析

将真核表达质粒 pCAGGS/HA-SVV-VP1、pCAGGS/HA-SVV-VP2、pCAGGS/HA-SVV-VP3 以及 pCAGGS/HA 空载体质粒按照前述操作方法转染 293T 细胞进行真核蛋白的瞬时表达。蛋白质免疫印迹分析中，首先以 HA 标签抗体作为检测抗体，结果检测到 3 条特异性条带，分别是 VP1（37KDa）、VP2（39KDa）和 VP3（34KDa）三种结构蛋白，条带大小正确，表明重组蛋白成功表达（图 4-14 A）。

随后将成功表达的重组蛋白作为抗原，以阳性杂交瘤细胞分泌的抗体作为一抗继续检测。结果显示 mAb-2C8、3E4、4C3、6D7、6E3、6E5 和 7C11 可与 SVV VP2 重组结构蛋白发生特异性结合，条带清晰可见（图 4-14 B-H），这 7 株抗体刚好与结果 4.3 高 ELISA 效价抗体一一对应。而 5A1、5D4 和 7H7 三株抗体均未能检测出任何条带，这 3 株抗体恰恰对应于结果 4.3 低 ELISA 效价抗体。由此可见，单克隆抗体的 ELISA 效价决定了蛋白质免疫印迹鉴定试验的成功与否，同时也可知中和效价和 ELISA 效价并不能都同步聚集于某一株抗体。

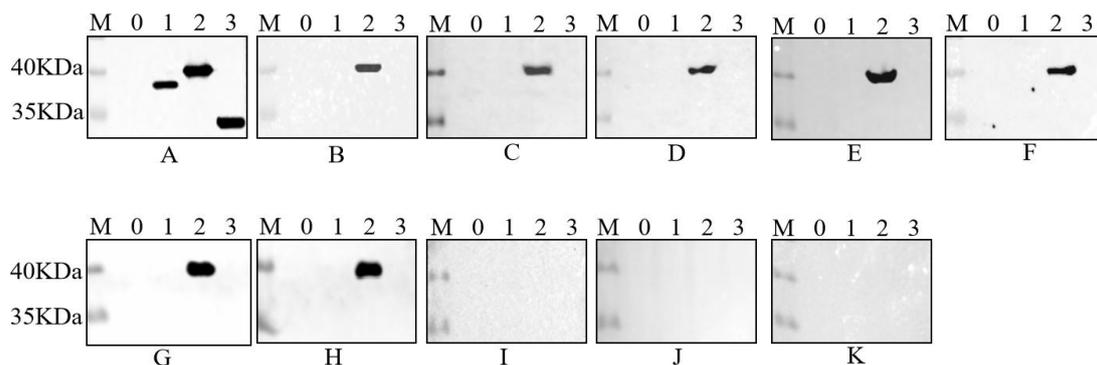


图 4-14 单抗与 SVV-LNSY01-2017 重组蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 4-14 Western-blot detection of mAbs and SVV-LNSY01-2017 recombinant protein

M: Protein Marker; 0: pCAGGS/HA Vector; 1: pCAGGS/HA-VP1; 2: pCAGGS/HA-VP2;

3: pCAGGS/HA-VP3; A: HA-Tag; B: 2C8-mAb; C: 3E4-mAb; D: 4C3-mAb; E: 6D7-mAb; F: 6E3-mAb;

G: 6E5-mAb; H: 7C11-mAb; I: 5A1-mAb; J: 5D4-mAb; K: 7H7-mAb

4. 10 单抗识别抗原区域的初步鉴定结果

4. 10. 1 PCR 扩增 VP2 基因截短片段

以 pCAGGS/HA-SVV-VP2 质粒为模板扩增 8 个截短基因片段，核酸电泳证明 8 个基因片段大小正确，与预期相符合（图 4-15）。

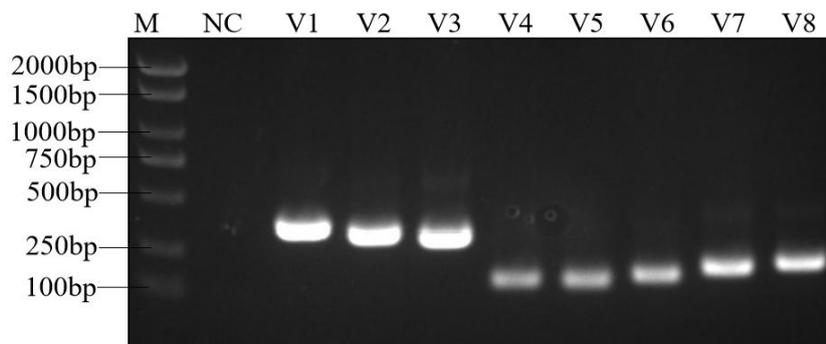


图 4-15 VP2 基因截短片段 PCR 扩增结果

Fig 4-15 The amplification results of VP2 gene truncated fragment

M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control; V1: 1: VP2-1 (1-330bp)-330bp;

V2: VP2-2 (301-600bp)-300bp; V3: VP2-3 (568-852bp)-285bp; V4: VP2-4 (301-414bp)-114bp;

V5: VP2-5 (385-498bp)-114bp; V6: VP2-6 (469-600bp)-132bp; V7: VP2-7 (301-459bp)-195bp;

V8: VP2-8 (427-600bp)-210bp

4.10.2 PCR 鉴定重组质粒

将 8 个基因片段的 PCR 产物进行胶回收、连接表达载体、转化大肠杆菌、菌液 PCR 鉴定、重组质粒提取、测序。各测序结果碱基匹配率 100%，表明重组质粒均已构建成功。

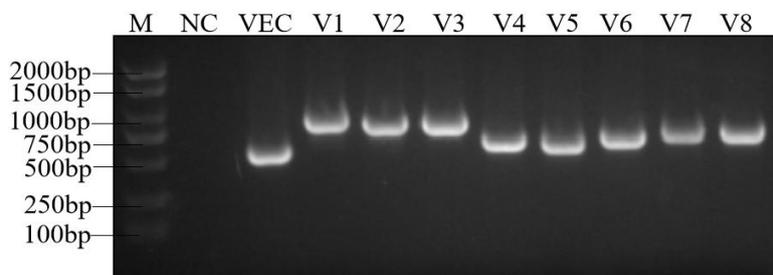


图 4-16 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig 4-16 PCR identification results of recombinant plasmid

M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control; VEC: pGEX-KG Vector-516bp; V1: VP2-1 (1-330bp)-768bp;
 V2: VP2-2 (301-600bp)-768bp; V3: VP2-3 (568-852bp)-758bp; V4: VP2-4 (301-414bp)-582bp; V5: VP2-5
 (385-498bp)-582bp; V6: VP2-6 (469-600bp)-600bp;
 V7: VP2-7 (301-459bp)-663bp; V8: VP2-8 (427-600bp)-678bp

4.10.3 Western-blot 鉴定中和表位

将 PCR 鉴定和测序鉴定正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中，挑取单菌落进行重组蛋白的诱导表达，将 GST 标签抗体作为检测抗体验证 8 个截短的重组蛋白全部表达 (图 4-17 A)。随后以 7 株高 ELISA 效价中和抗体的杂交瘤细胞培养上清作为检测抗体进行 Western-blot 检测，结果显示 7 株抗体均能够识别 V2、V5、V8 重组蛋白 (图 4-17 B)。根据 Western-blot 结果可以画出表位示意图，结果表明中和表位序列处于 VP2 蛋白的 143aa-166aa 之间 (图 4-18)。

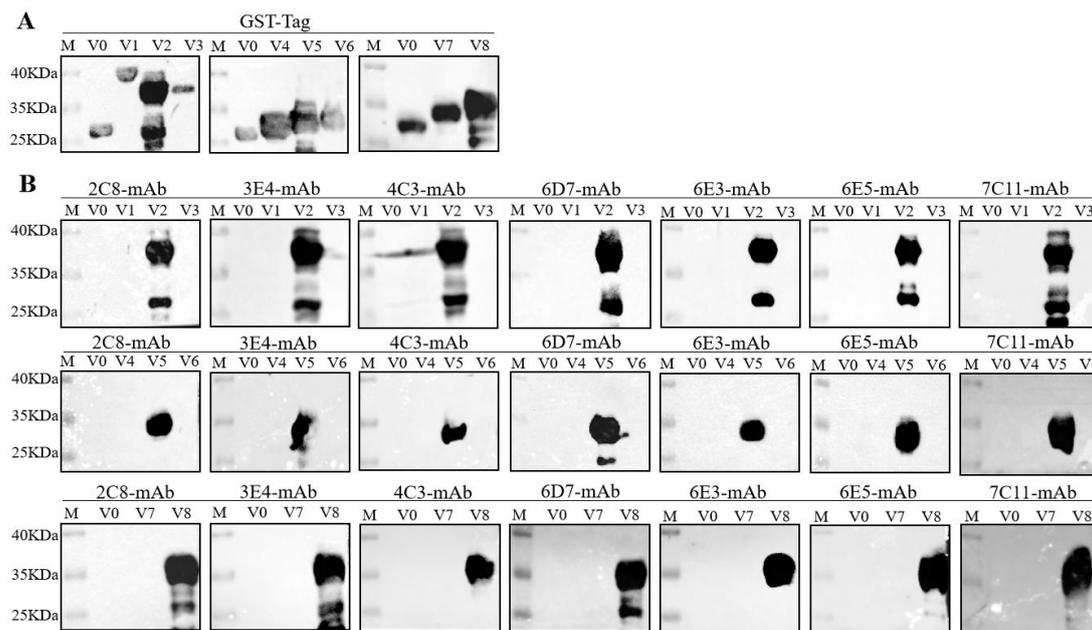


图 4-17 VP2 截短蛋白与 GST-Tag (A) 和 7 株中和单抗 (B) 的 Western-blot 结果
 Fig 4-17 Western-blot analysis of truncated VP2 against GST-Tag(A) and seven neutralizing monoclonal antibodies(B)

M: Protein Marker; V0: pGEX-KG vector-26KDa; V1: VP2-1 (1-110aa)-38KDa;

V2: VP2-2 (100-200aa)-37KDa; V3: VP2-3 (190-284aa)-36KDa; V4: VP2-4 (100-138aa)-30KDa;

V5: VP2-5 (129-166aa)-30KDa; V6: VP2-6 (157-200aa)-31KDa; V7: VP2-7 (100-153aa)-33KDa;

V8: VP2-8 (143-200aa)-34KDa

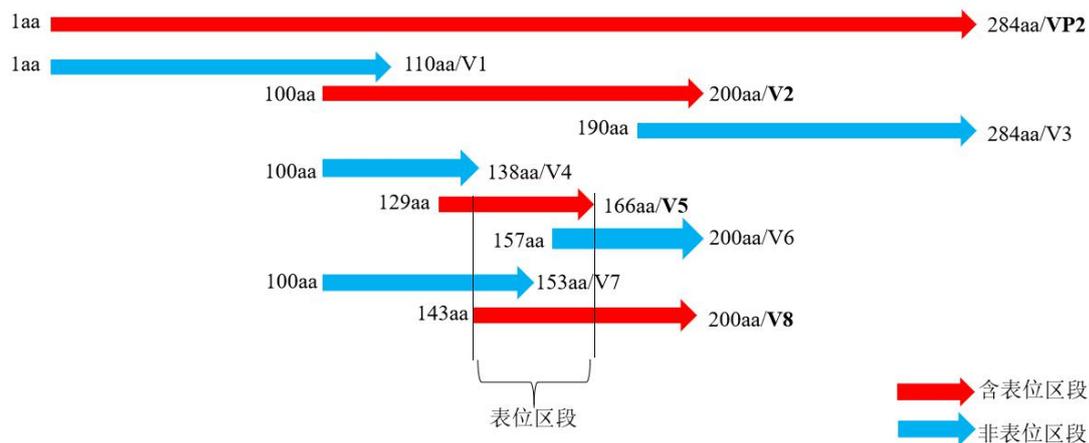


图 4-18 中和表位初步筛选示意图

Fig 4-18 The preliminary screening map of neutralizing epitope

4.11 单抗识别中和表位的精确鉴定结果

4.11.1 构建重组质粒

根据抗原表位初步鉴定的结果，将截短片段 V5 和 V8 之间重叠的序列 143aa-166aa 进行更为细致地截短。截短片段命名及其起始长度分别如图 4-19 所示。首先以 pCAGGS/HA-SVV-VP2 质粒为模板，利用设计的引物 PCR 扩增 VP2 的 9 个截短基因片段，核酸电泳检测各个基因片段大小正确，与预期相符合（图 4-19 A）。随后将该 9 个基因片段的 PCR 产物进行胶回收、连接载体、转化至大肠杆菌 DH5 α 中，使用通用引物进行菌液 PCR 鉴定，结果鉴定 9 个截短片段大小均符合预期（图 4-19 B）。对筛选出的阳性菌液进行重组质粒提取并测序，测序结果显示碱基匹配率 100%，表明重组质粒均已成功构建。

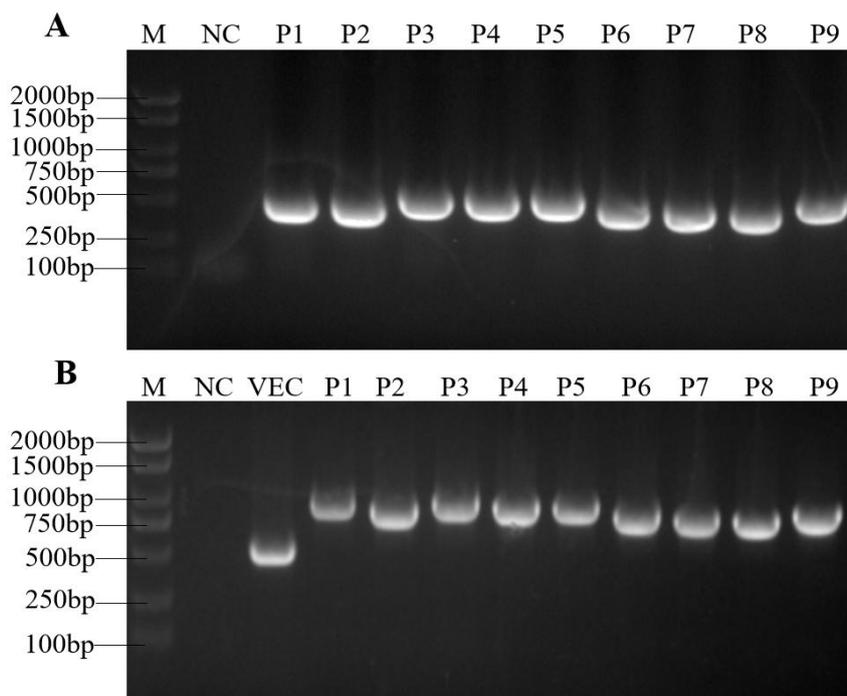


图 4-19 精确定位中和表位截短片段的 PCR 扩增 (A) 和 PCR 鉴定 (B) 结果

Fig 4-19 The result of accurate locating neutralizing epitope truncated fragments from PCR amplification (A) and PCR identification (B)

A) M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control; P1: VP2(442-852bp)-411bp; P2: VP2(460-852bp)-393bp; P3: VP2(1-477bp)-477bp; P4: VP2(1-465bp)-465bp; P5: VP2(1-471bp)-471bp; P6: VP2(448-852bp)-405bp; P7: VP2(454-852bp)-399bp; P8: VP2(457-852bp)-396bp; P9: VP2(1-474bp)-474bp

B) M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control; VEC: pGEX-KG Vector-516bp; P1: VP2(442-852bp)-849bp; P2: VP2(460-852bp)-831bp; P3: VP2(1-477bp)-915bp; P4: VP2(1-465bp)-903bp; P5: VP2(1-471bp)-909bp; P6: VP2(448-852bp)-843bp; P7: VP2(454-852bp)-837bp; P8: VP2(457-852bp)-834bp; P9: VP2(1-474bp)-912bp

4. 11. 2 Western-blot 精确鉴定中和表位

重复上述步骤，将构建成功的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中，并诱导重组蛋白的表达。首先以 GST 标签抗体作为检测抗体、证明了 9 个截短重组蛋白全部表达 (图 4-20)。紧接着再以 7 株中和抗体杂交瘤细胞培养上清 (1: 5) 作为检测抗体进行 Western-bolt 鉴定，结果显示 7 株中和抗体皆与 P1、P3、P6、P7、P8 和 P9 片段发生特异性结合 (图 4-20)，由该结果可作出精确定位中和表位的示意图，通过示意图可以明确确定中和单抗共同识别 VP2 蛋白的 153aa-158aa 表位序列，且该表位序列为最小片段 (图 4-21)，即 VP2 的中和表位是 aa153-aa158 (¹⁵³QELNEE¹⁵⁸)。

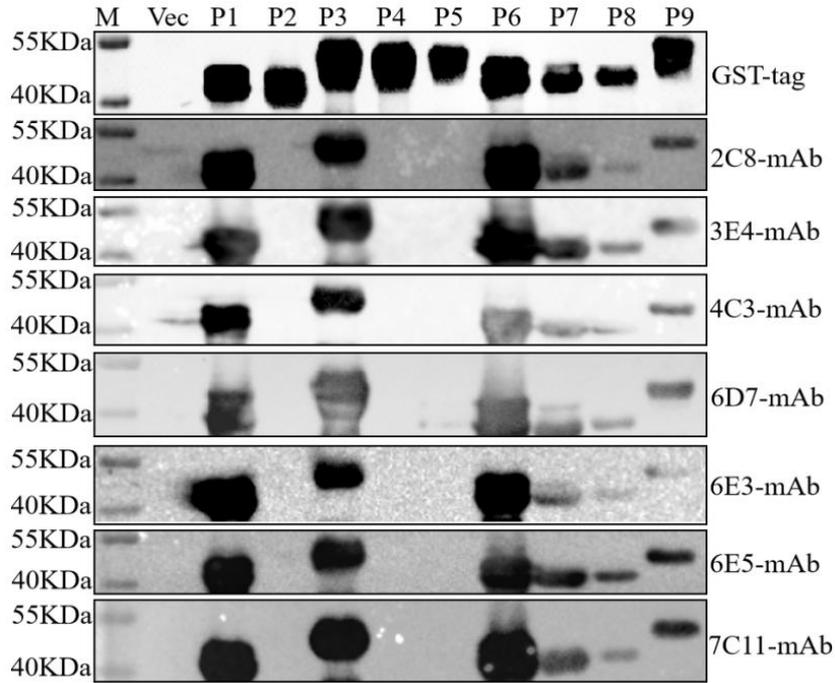


图 4-20 VP2 截短蛋白与 GST-Tag 和 7 株中和抗体的 Western-blot 结果

Fig 4-20 Western-blot analysis of truncated VP2 against GST-Tag and seven neutralizing monoclonal antibodies

M: Protein Marker; Vec: pGEX-KG Vector; P1: VP2(148-184aa)-42KDa; P2:VP2(154-284aa)- 40KDa; P3: VP2(1-159aa)-43KDa; P4: VP2(1-155aa)-43KDa; P5: VP2(1-157aa)-43KDa; P6: VP2(150-284aa)-40KDa; P7: VP2(152-284aa)-40KDa; P8: VP2(153-284aa)-40KDa; P9: VP2(1-158aa)-43KDa

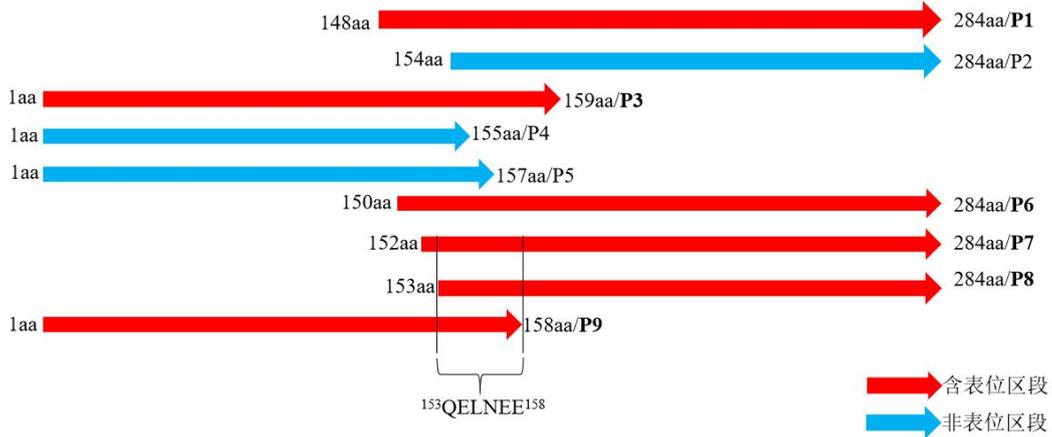


图 4-21 精确定位中和表位示意图

Fig 4-21 Schematic of pinpointing neutralizing epitopes

4.12 SVV 不同分离株的中和表位序列比对

将中和表位序列 $^{153}\text{QELNEE}^{158}$ 与在 GenBank 中下载的 26 株国内外 SVV 分离株 VP2 氨基酸序列进行比对，结果表明 VP2 蛋白 153aa-158aa 的氨基酸序列与世界上首例分离鉴定的 SVV-001 毒株和中国首次获得的 SVV-CH-2015 毒株、以及后续分离的其他毒株等完全相同，与美国、加拿大、巴西等分离毒株相比依旧没有差别，表明该中和表位在不同 SVV 分离株中高度保守；但其仅在 SVA-HLJ-CHA-2016 分离株中存在 1 个差异位点，该位点是 Q^{153}E （图 4-22）。

Consensus 27 Sequences	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
	130 140 150 160 170 180
LNSY01-2017	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-01-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-02-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-03-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-04-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-DB-11-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-DL-01-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-LX-01-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-ZW-01-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-FJ-2017	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-GXI09-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-HN-2017	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
CH-HNSL-2017	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-HLJ-CHA-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V R P D G K A K S L E E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
HB-CH-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVV-HN16	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVV-001	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
Colombia-2016	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
G103_SV_1-2016-Thailand	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
G103_SV_2-2016-Thailand	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
MN15-84-8	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-BRA-GO3-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-BRA-MG1-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-Canada-MB-NCFAD-104-1-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-Canada-ON-FMA-2015-0024T2-2015	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
SVA-OH1	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N
US-15-41901SD	QFHQGALLVAMVPEITL D V K P D G K A K S L Q E L N E E Q W V E M S D D Y R T G K N M P F Q S L G T Y Y R P F N

图 4-22 中和表位在 SVV 不同分离株间序列比对结果

Fig 4-22 Sequence alignments of neutralizing epitopes among different strains of SVV

4.13 中和表位关键性氨基酸位点验证

4.13.1 PCR 扩增 VP2 单点突变基因

以 SVV-LNSY01-2017 反转录 cDNA 为模板，利用自行设计的 12 对点突变引物分别扩增 VP2 (Q153A、E154A、L155A、N156A、E157A 和 E158A) 的上下游基因片段，PCR 产物通过核酸电泳显示各个基因片段大小正确，与预期相符合（图 4-23 A）。随后通过 DNA 胶回收试剂盒回收这 6 对上下游基因片段，紧接着利用融合 PCR 的方法分别将 6 对点突变基因片段进行拼接，由核酸电泳检测得知点突变基因片段大小全部正确无误（图 4-23 B）。再次使用 DNA 胶回收试剂盒回收 6 个点突变基因片段。

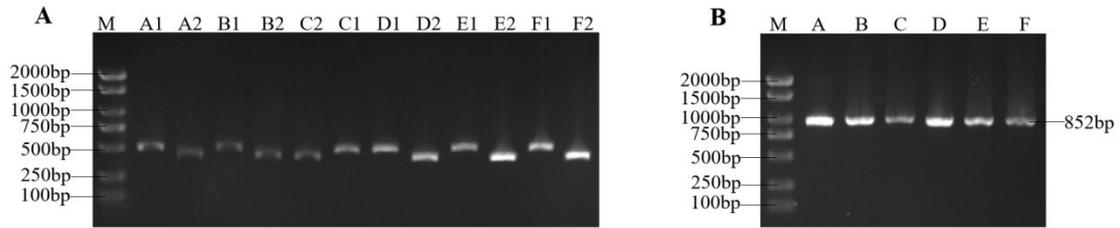


图 4-23 VP2 点突变基因上下游片段 PCR 扩增 (A) 和融合 PCR 扩增点突变全长 (B)

Fig 4-23 The PCR amplification of VP2 point mutation gene upstream and downstream fragments (A) and full length of fusion PCR amplification point mutation (B)

4. 13. 2 构建 VP2 单点突变质粒

将 PCR 得到的点突变基因通过内切酶酶切后，连接于 pCAGGS/HA 真核表达载体上，在转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行菌液 PCR 鉴定，结果显示目的片段大小正确（图 4-24）。对筛选出的阳性菌液进行重组质粒提取，并利用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 进行双酶切鉴定，结果可见大小为 852bp 的基因片段和 4795bp 的载体片段（图 4-25），酶切鉴定结果说明了点突变基因成功连接到真核表达质粒载体中。随后测序结果经过与原始序列比对显示碱基匹配率为 100%，表明 VP2 单点突变真核表达质粒均已成功构建。

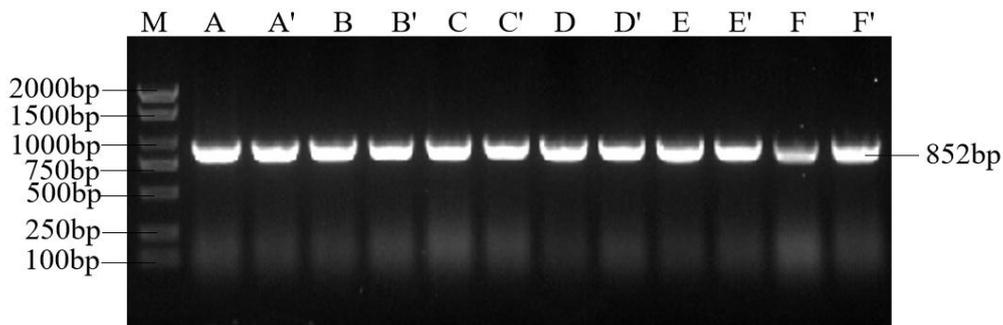


图 4-24 PCR 鉴定 VP2 单点突变基因

Fig 4-24 Identification of VP2 single point mutations by PCR

M: DL2000 DNA Marker; A/A': VP2-Q153A; B/B': VP2-E154A; C/C': VP2-L155A; D/D': VP2-N156A;
E/E': VP2-E157A; F/F': VP2-E158A

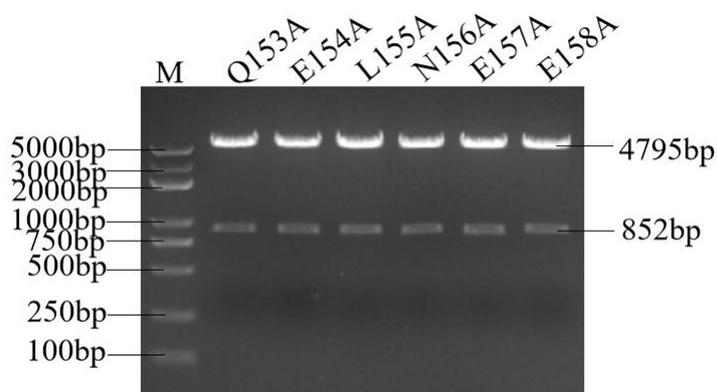


图 4-25 单点突变质粒酶切检测

Fig. 4-25 The enzyme detection of single point mutation plasmids

M: DL5000 DNA Marker; Q153A: pCAGGS/HA-VP2(Q153A); E154A: pCAGGS/HA-VP2(E154A);

L155A: pCAGGS/HA-VP2(L155A); N156A: pCAGGS/HA-VP2(N156A); E157A: pCAGGS/HA-VP2(E157A);

E158A: pCAGGS/HA-VP2(E158A)

4. 13. 3 Western-blot 鉴定关键性氨基酸位点

将成功构建的真核表达质粒 pCAGGS/HA-VP2 (Q153A)、pCAGGS/HA-VP2 (E154A)、pCAGGS/HA-VP2 (L155A)、pCAGGS/HA-VP2 (N156A)、pCAGGS/HA-VP2 (E157A)、pCAGGS/HA-VP2 (E158A) 以及 pCAGGS/HA-VP2 和 pCAGGS/HA 空载体质粒按照方法步骤里面的实验过程进行单点突变蛋白的转染表达。将表达的蛋白利用常规的蛋白质免疫印迹分析方法做鉴定，结果表明 VP2 蛋白及其 6 个单点突变蛋白均成功表达（图 4-26 A）。同时可见 6D7-mAb 可与 VP2 蛋白以及 VP2 (L155A) 蛋白和 VP2 (N156A) 蛋白显示出肉眼可见的条带，而其他四个单点突变蛋白均无特异性条带，表明了中和表位¹⁵³QELNEE¹⁵⁸的关键性氨基酸位点分别为 Q¹⁵³、E¹⁵⁴、E¹⁵⁷ 以及 E¹⁵⁸。

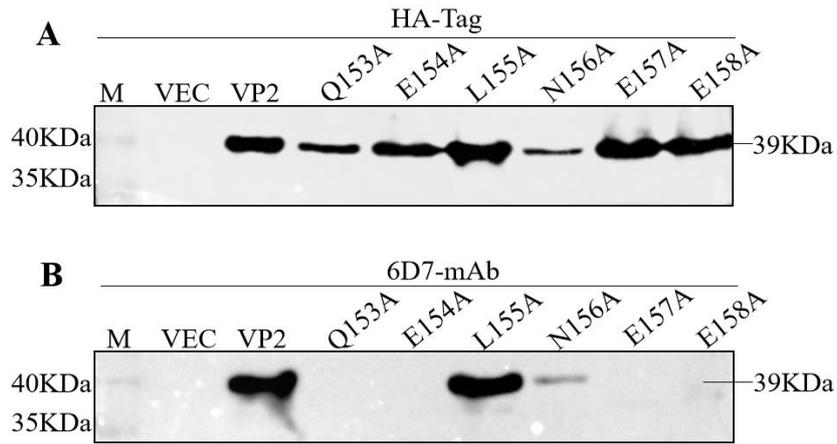


图 4-26 Western-blot 鉴定关键性氨基酸位点

Fig 4-26 Determination the key amino acid site by Western-blot

M: Protein Marker; VEC: pCAGGS/HA Vector; VP2: pCAGGS/HA-VP2; Q153A: pCAGGS/HA-VP2(Q153A);
E154A: pCAGGS/HA-VP2(E154A); L155A: pCAGGS/HA-VP2(L155A); N156A: pCAGGS/HA-VP2(N156A);
E157A: pCAGGS/HA-VP2(E157A); E158A: pCAGGS/HA-VP2(E158A)

5 讨论

5.1 制备免疫原

在制备单克隆抗体过程中往往对免疫原的纯度要求很高,这是十分重要的一点,直接关联着小鼠免疫试验的成功与否。本研究主要以超高速蔗糖密度梯度离心的方法纯化得到了塞内卡谷病毒颗粒,在测定病毒结构蛋白总浓度后,以此作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠。期间对塞内卡谷病毒的增殖和纯化都遇到了一些困难,首先为了获得最大病毒量,必须要预先测试病毒最佳接种剂量,病毒接种剂量增多会导致细胞过早凋亡,从而使得病毒在复制过程中丢失宿主而死亡;若病毒感染量过少,将导致细胞正常凋亡期间内病毒复制达不到平台期,病毒收获量减少。因此,经反复试验,我们最终确定塞内卡病的最佳接种剂量和最佳收毒时间。在纯化病毒这方面,依据实验室经验以及学习文献报道的方法,采取了蔗糖密度梯度离心的方法,收取了病毒带(即纯化的病毒),最后对纯化的塞内卡谷病毒进行 SDS-PAGE 验证、Western-blot 鉴定以及间接免疫荧光验证,确保所获免疫原正确无误。

5.2 免疫 BALB/C 小鼠

当前阶段免疫程序中多数是参考常规抗体制备的方法。免疫途径常为体内免疫法包含皮下注射和腹腔注射:前 3-4 次免疫通常为颈背部皮下多点注射法,免疫前需要加入等体积的弗氏佐剂进行乳化,目的是为了增强免疫效果,维持抗体水平不低落。细胞融合前加强免疫往往采用腹腔注射法,不需要佐剂,这样可使免疫效果更加夯实有效。在加强免疫后应该尽快做好细胞融合的准备,实验器材的消毒和整洁的操作环境有助于提高细胞融合成功率。本研究,我们采用了超高速蔗糖密度梯度离心的方法获得了高浓度和高纯度的免疫原,为后续试验奠定了物质基础。然后采用 40 微克每只的免疫剂量,经过 3 次免疫后,检测免疫鼠血清效价达到 1:12800 时,可以对小鼠处死取脾脏用于细胞融合。

5.3 细胞融合

小鼠骨髓瘤细胞具有无限分裂能力,由于该细胞并非高度分化的细胞,因此分裂能力较强,而其它肿瘤细胞分裂能力较弱,因此多在制备单克隆抗体时与 B 淋巴细胞融合,使单克隆抗体迅速大量增殖,对成功得到杂交瘤是最为重要的(王

晓桃 等 2019)。杂交瘤抗体技术的应用是单克隆抗体制备的有效手段，它使得两种不同源的细胞在特定的环境里进行相互融合，这样两个细胞的基因组就有机的结合在一起，既利用了瘤细胞无限分裂增殖的能力，以使得细胞能重复利用和冻存，又利用了脾细胞编码特异性抗体蛋白的基因组实现单克隆抗体的分泌。

5.4 杂交瘤细胞的筛选

融合后 10 天左右，杂交瘤细胞基本上可以达到筛选要求，把融合成功的瘤细胞孔内细胞上清吸取出来做相应检测。一般来说，抗体检测方法都是以间接 ELISA 为主，该方法有快速、简便，便于一次性处理大量样品等特点。本试验前期依据该方法能够检测出高 ELISA 效价抗体，但是通过病毒中和试验未能验证出中和活性，因而舍弃了该方法。后续实验主要以病毒中和试验法作为筛选方法，但一次中和试验结果往往需要 2 至 3 天的观察时间，对于筛选过程是较为漫长的，而杂交瘤细胞生长速度较快，基本上每两天就要换液传代一次，在等待过程中，还需要对大量的细胞进行换液处理，花费的时间和人力成本很大，因此实验人员需要更加细心和更多耐力。

本研究利用病毒中和试验的方法，通过多次验证，准确的筛选到了对塞内卡谷病毒具有中和效果的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。值得注意的是，筛选成功率极低，我们前后一共融合了 10 只免疫小鼠用于抗体筛选，但是能中和塞内卡谷病毒的 mAb 较少，同时部分疑似具备中和能力的细胞株存在假阳性，往往在传代两次后就丢失中和抗性。经过反复验证，最终我们得到了 10 株能中和塞内卡谷病毒的单克隆抗体。

5.5 亚克隆

从融合成功的孔中得到的杂交瘤细胞，其分泌的抗体有极大的概率来源于两个以上的杂交瘤细胞，同时也存在不分泌抗体或分泌无效抗体的细胞，因此所确定的某个阳性原始孔杂交瘤细胞分泌的抗体大概率是混合型抗体。为了得到能中和塞内卡谷病毒的单克隆抗体，对杂交瘤细胞进行多次亚克隆试验是必需的。因而为了保险起见，此类细胞理应作克隆化处理，以期获得稳定传代且分泌单独一种中和性单克隆抗体的杂交瘤细胞。一般情况下，在得到中和塞内卡谷病毒的杂交瘤细胞以后，需要连续进行三次以上的亚克隆试验，每次亚克隆后都需要通过病毒中和试验检测为绝对具备中和能力方可继续下一步试验。本实验室主要采用

有限稀释法，该方法获得的亚克隆细胞株数量多，能够有效筛选出需要的细胞，但是耗时长，工作量大，一次亚克隆往往需要 15-20 天才能完成。若实验室条件允许，单细胞显微操作法可能更加行之有效，但是细胞污染可能性较大，无菌操作要求更高。其他方法尚未涉及。

5.6 中和单抗的验证

为了保持免疫原的天然构象和维持其良好的免疫原性（邹年莉 2015），本研究用 SVV-LNSY01-2017 株超离纯化的病毒粒子作为免疫原免疫小鼠，因其对小鼠感染不至死（Joshi et al 2016），故而未经灭活直接乳化后使用。这种利用活毒免疫的方法能够有效模拟病毒抗原侵袭机体产生免疫应答的过程，使得机体获得接近野毒感染产生的抗体，同时也能避免体外蛋白表达和纯化的过程。有报道称，低剂量长时间的免疫程序，可以诱导机体产生 IgG 类高亲和力的抗体（Champion et al 1985），因而本研究采用每只小鼠 40 微克，每隔 14 天免疫一次，共免疫 4 次以上的免疫方案，最终筛选得到了 9 株 IgG2a 亚型的中和单抗（第 10 株抗体亚型为 IgA）。通过病毒中和试验检测，10 株单克隆抗体对亲本毒株均有较高的中和效价，单纯的细胞培养上清中和效价最高可达到 1: 2⁷，同时对本实验室 2016 年分离得到的 SVV-HB-2016 毒株也同样具备中和效果，最高能达到 1: 2⁶。为了提高单抗的中和效价，提高单抗的蛋白浓度，我们选择培养状态处于最稳定期的细胞进行小鼠腹水的制备。随着腹水的产出和纯化，在测定抗体蛋白浓度后，依次对 10 株抗体做亲本毒株的病毒中和试验检测，结果表明腹水的中和效价显著高于细胞培养上清，最高者可达 1: 2¹⁰。

本研究获得的 10 株中和单抗全部可被 SVV-LNSY01-2017 病毒的间接免疫荧光试验检测出来，其中有 7 株可通过重组蛋白的 Western-blot 实验检测出来，结果说明这 7 株单抗可同时识别 SVV 的构象表位与线性表位，其他 3 株单抗只能识别构象表位。同时，这 7 株中和单抗只能与结构蛋白 VP2 发生特异性结合，由此可以判定，VP2 蛋白具有更好的免疫原性，存在中和表位。

对于 7 株中和抗体共同识别 VP2 结构蛋白，我有以下理解：首先 VP2 蛋白是暴露于外表面的，这是与 VP1 和 VP3 蛋白具有的共同特征，然后 VP2 蛋白是 3 个结构蛋白中分子质量最大的，它的亲水性和抗原性的几率应该会更大；其次根据外国研究人员的研究结果可以得出结论，感染了 SVV 的猪血清抗体可以做

病毒中和实验, 竞争酶联免疫吸附实验和间接免疫荧光实验, 它们的卡伯系数评估此 3 类实验之间存在很高的一致性, 即病猪的血清抗体存在中和抗体, 同时也是优势抗体 (Goolia M et al 2017); 随后又有研究学者认为 VP2 蛋白的免疫原性比 VP1 蛋白和 VP3 蛋白相对较好, 判定 VP2 蛋白是刺激机体产生中和抗体的最佳蛋白 (Dvorak et al 2017); 最后中和表位相对于普通表位来说比较稀少, 好比是蛇之七寸, 所制备的抗体是能够中和病毒并阻止其感染行为的。综上所述, 我认为以 SVV 全病毒颗粒作为免疫原, 真实还原了自然毒感染机体所发生的一系列免疫反应, 故 7 株高 ELISA 效价抗体共同抗 VP2 蛋白。

5.7 中和表位鉴定的研究

本研究主要以探索线性表位为主。应用大肠杆菌原核表达系统, 通过依次截短 VP2 蛋白, 最终筛选出 7 株中和单抗共同识别的最短肽段 VP2(¹⁵³QELNEE¹⁵⁸) 153aa-158aa。对比国内外 SVV 不同分离株的 VP2 氨基酸序列发现, 仅仅 SVV-HLJ-CHA-2016 株存在差异位点 Q¹⁵³E, 其他分离株于 VP2 153aa-158aa 序列处均保持高度一致, 表明所鉴定的中和表位高度保守。因单抗与抗原的结合的本质是抗体与表位的识别, SVV 的保守表位提供了本实验单克隆抗体特异性识别大部分 SVV 不同分离株的可能, 同时这一结果表明我们所制备的中和抗体对不同 SVV 分离毒株很有可能具备广谱中和效果, 不过很可惜, 目前尚未做不同分离毒株的病毒中和试验验证。

5.8 中和表位关键性氨基酸位点验证的研究

由于中和表位在 SVV 不同分离株的 VP2 蛋白质序列内处于高度保守状态, 故而分别将这 6aa 长度的中和表位依次进行单点突变, 即 ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸ 的每个位点都分别以丙氨酸代替, 以期找到关键性氨基酸位点。本次实验主要以真核表达系统进行 293T 细胞转染的瞬时表达蛋白做为抗原, 以无论是细胞传代稳定性、中和效价、ELISA 效价、IFA 荧光强度, 还是 SVV 阳性血清阻断率都最好的 6D7-mAb 作为检测抗体, 做 Western-blot 检测。结果表明单独突变 VP2-Q¹⁵³、VP2-E¹⁵⁴、VP2-E¹⁵⁷ 和 VP2-E¹⁵⁸ 这 4 个位点, VP2 单点突变蛋白就不能被 6D7-mAb 识别, 因此 6D7-mAb 识别的关键性氨基酸位点分别为 VP2-Q¹⁵³、VP2-E¹⁵⁴、VP2-E¹⁵⁷ 和 VP2-E¹⁵⁸。而单独突变 VP2-L¹⁵⁵ 和 VP2-N¹⁵⁶ 对 6D7-mAb 的结合没有明显影响, 表明 VP2-L¹⁵⁵ 和 VP2-N¹⁵⁶ 不是中和抗体 6D7 所识别表位的关键性氨

基酸位点。总之，我们成功开发了 7 株对 SVV 具有特异性和敏感性的单克隆抗体，已成功用于 IFA，Western-blot 和 NT 对 SVV 的检测。此外，我们鉴定了保守表位 VP2（¹⁵³QELNEE¹⁵⁸），使该研究首次报道了精确的 VP2 蛋白中和表位。我们的研究在 SVV 感染的诊断以及 SVV VP2 蛋白的基序结构、功能和抗原性研究中具有潜在的应用。

6 结论

1、本实验利用超高速低温离心的方法纯化了 SVV-LNSY01-2017 病毒颗粒，由小鼠免疫、细胞融合、HAT 选择培养、病毒中和试验筛选以及细胞亚克隆，最后稳定建株，得到 10 株中和性单克隆抗体细胞株，它们分别是：2C8、3E4、4C3、5A1、5D4、6D7、6E3、6E5、7C11、7H7，它们能同时中和亲本毒株以及 SVV-HB-2016 分离株。亚型鉴定显示，7H7 单抗亚型为 IgA/Kappa，其余 9 株单抗亚型为 IgG2a/Kappa。

2、经 IFA 实验鉴定表明，制备的 10 株单抗均能识别 SVV 病毒的构象表位：其中有 7 株高 ELISA 效价单抗能与 VP2 重组蛋白发生特异性结合，表明它们能识别 VP2 线性表位；有 3 株低 ELISA 效价单抗不能识别 SVV 重组蛋白，表明其仅识别 SVV 构象表位。

3、利用截短表达的方法，鉴定了 VP2 蛋白的中和表位是 ¹⁵³QELNEE¹⁵⁸，通过氨基酸序列比对证明该表位序列高度保守，通过单点突变验证了关键性氨基酸位点分别为 Q¹⁵³、E¹⁵⁴、E¹⁵⁷ 和 E¹⁵⁸。

参考文献

1. 花群俊, 林彦星, 杨仕标. 猪 A 型塞内卡病毒研究进展[J]. 云南畜牧兽医, 2019 (03): 27-30.
2. 黄健强, 吴静波. 猪塞内卡病毒研究进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40 (03): 82-88.
3. 刘涛. 基于改进的人工神经网络方法预测 CTL 表位[J]. 大连理工大学学报, 2007, 04.
4. 王晓桃, 田申, 何玉婵, 吴春叶, 张俊艳, 阳少芳, 王航飞, You Lidan. 运用液体流动装置模拟的流体剪切应力下骨髓瘤细胞对骨细胞、破骨细胞和骨细胞表达 RANKL 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(02): 251-256.
5. 魏衍全, 郭慧琛, 徐进, 孙德惠, 孙世琪. 参与小 RNA 病毒感染和复制的宿主及病毒蛋白功能研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29 (1): 82-85.
6. 赵晓亚, 伍绮文, 伍子娴, 陈桂华, 白杨, 马静云. 国内首株猪塞内加谷病毒(Seneca Valley virus)的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 39 (11): 839-843.
7. 张伟, 余传信. 抗原表位的研究进展及其应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(01): 99-103.
8. 张永宁, 吴绍强, 林祥梅. 塞内卡病毒病研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(08): 1381-1388.
9. 邹年莉. 鸡传染性支气管炎病毒 Sczy3 S1 蛋白中和性单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[D]. 四川农业大学, 2015.
10. Alais M, Flavia MM, Raquel AL, Thalita ESO, Selwyn AH, Amauri A, Alice FA. Quantitative analysis of senecavirus A in tissue samples from naturally infected newborn piglets[J]. *Archives of Virology*, 2017, 163, 527-531.
11. Alexandersen S, Knowles NJ, Dekker A, Belsham GJ, Zhang Z, Koene F. Picornaviruses. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, et al. eds. Diseases of Swine. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2012:587-620.
12. Anahit G, Irina P, Hayk D, Armine H, Tommy S, Arpine D, David H C, Michael GA. Immunogenicity of Epitope Vaccines Targeting Different B Cell Antigenic Determinants of Human α -Synuclein: Feasibility Study[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 560: 86-91.
13. Barbosa MD, Celis E. Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses[J]. *Drug Discov Today*, 2007; 12(15-16): 674-81.
14. Bond KB, Sriwanthana B, Hodge TW, De Groot AS, Mastro TD, Young NL,

- Promadej N, Altman JD, Limpakarnjanarat K, McNicholl JM. An HLA-directed molecular and bioinformatics approach identifies new HLA-A11 HIV-1 subtype E cytotoxic T lymphocyte epitopes in HIV-1-infected Thais[J]. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2001, 17(8): 703-717.
15. Canning P, Canon A, Bates JL, Gerardy K, Linhares DC, Piñeyro PE, Schwartz KJ, Yoon KJ, Rademacher CJ, Holtkamp D, Karriker L. Neonatal Mortality, Vesicular Lesions and Lameness Associated with Senecavirus A in a U.S. Sow Farm[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(4): 373-378.
 16. De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics[J]. *Drug Discov Today*, 2006; 11(5-6): 203-9.
 17. DeLay J, Fairles J, Ojkic D. Senecavirus A in pigs. *Univ Guelph AHL Newsletter*, 2015, 19(4): 39.
 18. Dvorak CM, Akkutay-Yoldar Z, Stone SR, Tousignant SJ, Vannucci FA, Murtaugh MP. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1):50.
 19. Fan Y, Zhu ZX, Cao WJ ,Liu HN Zhang KH, Tian H, Liu XT, Zheng HX. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs[J]. *Vaccine*, 2018, 36(6).
 20. Flach W. Watching for seneca valley virus and killing feral hogs [Z/OL]. [2017-05-24].
 21. Gimenez-Lirola LG, Rademacher C, Linhares D, Harmon K, Rotolo M, Sun Y, Baum DH, Zimmerman J, Piñeyro P. Serological and Molecular Detection of Senecavirus A Associated with an Outbreak of Swine Idiopathic Vesicular Disease and Neonatal Mortality[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(8): 2082-2089.
 22. Goolia M, Vannucci F, Yang M, Patnayak D, Babiuk S, Nfon CK. Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2017, 29(2): 250-253.
 23. Guo B, Piñeyro PE, Rademacher CJ, Zheng Y, Li G, Yuan J, Hoang H, Gauger PC, Madson DM, Schwartz KJ, Canning PE, Arruda BL, Cooper VL, Baum DH, Linhares DC, Main RG, Yoon KJ. Novel Senecavirus A in Swine with Vesicular Disease, United States, July 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1325-1327.
 24. Hales LM, Knowles NJ, Reddy PS, Xu L, Hay C, Hallenbeck PL. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89: 1265-1275.
 25. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino

- acid sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(6): 3824-3828.
26. Joshi LR, Fernandes MHV, Clement T, Lawson S, Pillatzki A, Resende TP, Vannucci FA, Kutish GF, Nelson EA, Diel DG. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs[J]. *J Gen Virol*, 2016a, 97(12): 3267-3279.
 27. Joshi LR, Mohr KA, Clement T, Hain KS, Myers B, Yaros J, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Gava D, Schaefer R, Caron L, Dee S, Diel DG. Detection of the Emerging Picornavirus Senecavirus A in Pigs, Mice, and Houseflies[J]. *J Clin Microbiol*, 2016b, 54(6): 1536-1545.
 28. Knowles NJ. A pan-RT picornavirus RT-PCR: identification of novel picornavirus species. EUROPIC 2005: 13th Meet Euro Study Group Mol Biol Picornaviruses 2005; Abstract 06.
 29. Knowles NJ, Hales LM, Jones BH, et al. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. Northern Lights EUROPIC 2006: XIV Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Saarieslka, Inari, Finland, 2006. [2017-05-24]. <http://www.europic.org.uk/Europic2006/posters/Knowles.svv.01.pdf>.
 30. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O, Nielsen M. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions[J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(8): 2295-2303.
 31. Leme RA, Zotti E, Alcântara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, Alfieri AA. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 603-611.
 32. Leme RA, Oliveira TE, Alcântara BK, Headley SA, Alfieri AF, Yang M, Alfieri AA. Clinical Manifestations of Senecavirus A Infection in Neonatal Pigs, Brazil, 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1238-1241.
 33. Leme RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Update on Senecavirus Infection in Pigs[J]. *Viruses*, 2017, 9(7): 170.
 34. Maggioli MF, Lawson S, de Lima M, Joshi LR, Faccin TC, Bauermann FV, Diel DG. Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs[J]. *J Virol*, 2018, 92(3): pii: e01717-17.
 35. Montiel N, Buckley A, Guo B, Kulshreshtha V, VanGeelen A, Hoang H, Rademacher C, Yoon KJ, Lager K. Vesicular Disease in 9-Week-Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1246-1248.
 36. Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in

- Manitoba[J]. *Can Vet J*, 2008, 49(1): 84-85.
37. Phei ES, Er-Wei S. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy[J]. *Protein & cell*, 2019, 10(11): 787-807.
 38. Ponomarenko J, Bui HH, Li W. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008; 9: 514.
 39. Qian SH, Fan W, Qian P, Chen HC, Li XM. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016[J]. *Virol J*, 2016, 13(1): 173.
 40. Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:796-839.
 41. Schulz, Kevin. Don't assume "it's only Seneca Valley Virus[J]. *National Hog Farmer*, 2015.
 42. Saeng-Chuto K, Rodtian P, Temeeyasen G, Wegner M, Nilubol D. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(1): 285-288.
 43. Segales J, Barcellos D, Alfieri A, Burrough E, Marthaler D. Senecavirus A: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs[J]? *Veterinary Pathology*, 2016, 54(1):11.
 44. Segales J, Barcellos D, Alfieri A, Burrough E, Marthaler D. Senecavirus A[J]. *Vet Pathol*, 2017, 54(1): 11-21.
 45. Singh K, Corner S, Clark SG, et al. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease[J]. *J Vet Sci Technol*, 2012, 3(6): 1000123.
 46. Steven JP, Tousignant, Laura B, Jake S, Fabio V, Stephanie R Douglas G. Marthaler. Longitudinal study of Senecavirus a shedding in sows and piglets on a single United States farm during an outbreak of vesicular disease[J]. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 277.
 47. Sun D, Chen S, Cheng A, Wang M. Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells[J]. *Viruses*, 2016, 8(3): 82.
 48. Vannucci FA, Linhares DC, Barcellos DE, Lam HC, Collins J, Marthaler D. Identification and Complete Genome of Seneca Valley Virus in Vesicular Fluid and Sera of Pigs Affected with Idiopathic Vesicular Disease, Brazil[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 589-593.
 49. Van Regenmortel MHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity[J]. *Methods*, 1996; 9(3): 465-72.
 50. Venkataraman S, Reddy SP, Loo J, Idamakanti N, Hallenbeck PL, Reddy VS. Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus representing a

- new genus[J]. *Structure*, 2008, 16(10): 1555-1561.
51. Viral Zone. Senecavirus [EB/OL] [2015-01-29]. <https://viralzone.expasy.org/697.html>.
52. Wadhwa L, Hurwitz MY, Chévez-Barrios P, Hurwitz RL. Treatment of invasive retinoblastoma in a murine model using an oncolytic picornavirus[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10653-10656.
53. Willcocks MM, Locker N, Gomwalk Z, Royall E, Bakhshesh M, Belsham GJ, Idamakanti N, Burroughs KD, Reddy PS, Hallenbeck PL, Roberts LO. Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES[J]. *J Virol*, 2011, 85(9):4452-4461.
54. Wu Q, Zhao X, Chen Y, He X, Zhang G, Ma J. Complete Genome Sequence of Seneca Valley Virus CH-01-2015 Identified in China[J]. *Genome Announc*, 2016, 4(1). pii: e01509-15.
55. Yang M, Bruggen R, Xu W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2012, 24(1): 42-50.
56. Zhang J, Piñeyro P, Chen Q, Zheng Y, Li G, Rademacher C, Derscheid R, Guo B, Yoon KJ, Madson D, Gauger P, Schwartz K, Harmon K, Linhares D, Main R. Full-length genome sequences of Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U.S. swine[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(6). pii: e01270-15.
57. Zhen HC, Fang FY, Yan HL, Peng CS, Robin S, Kelly L, Jamie H, Benjamin H, Jianfa B, Raymond RRR, Alfonso C, Ying F. Construction and characterization of a full-length cDNA infectious clone of emerging porcine Senecavirus A[J]. *Virology*, 2016, 497: 111-124.

致谢

本论文是在导师李祥敏教授和钱平教授的悉心指导下完成的，导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。不禁使我树立了远大的学术目标、掌握基本的研究方法，还使我明白了许多待人接物与为人处事的道理。本论文从选题到完成，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血，在此，谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

本论文的顺利完成，离不开各位老师、同学和朋友的关心和帮助。在此感谢李祥敏教授和钱平教授的指导和帮助；感谢实验室张华伟博士、马辉博士、刘婷婷博士、李江龙博士、赵泽凯博士、文威博士、方奎博士、陈义宝博士、朱和超博士、高东阳博士、丹尼博士、饶婷婷师姐、崔小芳师姐、莫红方师姐、王玉娟师姐、刘璐师姐、赵芳师姐、刘文强师兄、陈鑫师兄在实验上对我的帮助和指导。感谢同窗胡益、刘雪雁、覃柳婷、姚慧敏硕士的真诚帮助，长时间的相处帮我们建立起了深厚的友谊，我们共同成长的美好时光将让我永生难忘。在研究生学习期间也少不了师弟师妹们的帮助，感谢李慧、杨慧玲、银梦阁、姚慢慢、汪波翰、刘畅、王爽、李鑫鑫、胡大悦、关铃玉、商献菲、赵琼琼、汪雨、荣振香等师弟师妹的真诚协助。特别感谢实验室的管家陈慧贞师姐对我实验上的鼎力支持，每次试剂耗材的订购都是及时而有效的，你的辛勤付出造福了全实验室啊！

最后，感谢我的家人和朋友，他们对的支持是我继续前进的动力和后盾，让我能够在踏向未来的路上一往无前！