

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 硕士学位论文

## 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区的表达 及其单克隆抗体的制备

Expression of the Truncated E2 Protein of Classical Swine Fever  
Virus in *Escherichi coli* and Preparation of a Monoclonal Antibody  
against E2 Protein

硕 士 研 究 生：侯 强

指 导 教 师：仇华吉 研究员

申 请 学 位 类 别：农学硕士

专 业：预防兽医学

研 究 方 向：分子病毒学与免疫学

培 养 单 位：研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**  
**Master Degree Dissertation**

**Expression of the Truncated E2 Protein of Classical Swine Fever  
Virus in *Escherichi coli* and Preparation of a Monoclonal Antibody  
against E2 Protein**

Ms. Candidate : Hou Qiang

Advisor : Prof. Qiu Huaji

Major : Preventive Veterinary Medicine

Specialty : Molecular Virology and Immunology

Chinese Academy of Agricultural Sciences

**June 2006**

# 独 创 性 声 明

本人声明所呈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，也不包含为获得中国农业科学院或其它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了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院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。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导 师 签 名：

时间： 年 月 日

## 论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区的表达及其单克隆抗体的制备				
论文作者	侯 强	指导教师	仇华吉 研究员	培养单位	哈尔滨兽医研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
	刘胜旺	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	李一经	教授	博导	东北农业大学	预防兽医学
答辩主席	崔玉东	教授	博导	八一农垦大学	预防兽医学
	魏萍	教授	博导	东北农业大学	预防兽医学
	刘长明	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	蔡雪辉	副研究员	硕导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	李曦	副研究员	硕导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
答辩时间、地点	2006 年 6 月 16 日于哈尔滨兽医研究所				
记 录	刘永刚				

# 摘 要

猪瘟病毒 ( classical swine fever virus ; CSFV ) E2 囊膜糖蛋白是猪瘟病毒的主要结构蛋白之一, 是猪瘟病毒中和抗体的主要靶标, 是抗猪瘟病毒感染的主要保护性抗原; 因此, 猪瘟病毒 E2 蛋白是开发猪瘟新型疫苗、诊断试剂及研究猪瘟病毒致病机理的重要蛋白分子。

利用 TRIzol 试剂提取猪瘟病毒免化弱毒疫苗( C 株 )的基因组 RNA ,经反转录获取其 cDNA ,再以 cDNA 为模板, 扩增编码 E2 蛋白主要抗原区的 DNA 片段 ( 378bp ), 再将扩增产物正确插入到原核表达载体 pPROEX-HTb 中 ,得到重组质粒 pPROEX-tE2 ,然后以其转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  ,经 IPTG 诱导, 高效表达出了带有组氨酸标签的截短的重组蛋白 ( tE2 ), 占细菌总蛋白的 35%。经 Western blotting 分析和间接 ELISA 检测, 该重组蛋白能被猪瘟病毒抗血清所识别。

用 IPTG 大量诱导重组质粒 pPROEX-tE2 转化菌后, 通过亲和层析柱纯化重组蛋白 tE2 ,以纯化的 tE2 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 然后取抗体转阳免疫小鼠的脾淋巴细胞, 以 PEG 与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 经过 3~5 轮的筛选和纯化, 最终获得一株能稳定分泌抗 CSFV E2 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。经鉴定, 该株单克隆抗体能够与 CSFV C 株和石门株特异性结合, 且识别 CSFV E2 蛋白上的一个线性表位; 该单克隆抗体重链为 IgG1 亚型, 轻链为  $\kappa$  型。

总之, 本研究利用原核表达系统高效表达了 CSFV E2 蛋白的主要抗原区, 然后以该重组蛋白作为免疫原制备了一株能够稳定分泌抗 E2 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞, 为以后建立猪瘟诊断方法和研究 CSFV E2 蛋白的结构与功能提供了材料。

关键词: 猪瘟病毒; E2 基因; 原核表达; 单克隆抗体

## Abstract

The envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV) is responsible for the elicitation of neutralizing antibodies. It is often used in developing new type vaccines, clinical diagnostic reagents and studying immunopathological mechanisms of the virus.

A truncated E2 gene encoding the major antigenic regions of E2 protein was amplified by RT-PCR from the genomic RNA of CSFV C-strain and cloned into pPROEX-HTb expression vector, resulting in pPROEX-tE2. The truncated E2 protein (tE2) was expressed with high-level in pPROEX-tE2-transformed *Escherichia coli* cells after induction by IPTG, as demonstrated by SDS-PAGE analysis. The recombinant protein could be recognized by CSFV antisera in either Western blotting or ELISA.

The tE2 protein purified on a Ni-chelating HisTrap affinity column was used to immunize BALB/c mice, of which spleen cells were fused with SP2/0 cells with PEG3250 after 3 immunizations. A hybridoma cell line stably secreting monoclonal antibody (McAb) directed against the tE2 protein was selected by ELISA. The McAb was proved to be CSFV-specific and recognize a linear epitope on the E2 protein of CSFV C-strain or Shimen strain. The McAb was identified to be IgG1 subtype and kappa light chain.

In summary, the truncated E2 protein of CSFV was expressed in *E. coli* and a hybridoma cell line secreting McAb directed against CSFV E2 protein was developed, which can be used to develop diagnostic assays and study the structure-function of CSFV E2 protein.

Keywords: classical swine fever virus (CSFV); E2 protein; procaryotic expression; monoclonal antibody

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
CSF	classical swine fever	猪瘟
BVD	bovine viral diarrhoea	牛病毒性腹泻
BD	border disease	羊边界病
CSFV	classical swine fever virus	猪瘟病毒
BVDV	bovine viral diarrhoea virus	牛病毒性腹泻病毒
BDV	border disease virus	羊边界病病毒
McAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
kDa	kilodalton	千道尔顿
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
IPMA	immunoperoxidase monolayer assay	免疫过氧化物酶单层试验
PK	porcine kidney(cells)	猪肾细胞
IU	international unit	国际单位
LB	Luria-Bertani	LB 液体培养基
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
OPD	<i>O</i> -phenylenediamine	联苯二胺
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine	次黄嘌呤、氨基喋呤与胸苷
HT	Hypoxanthine-and thymidine	次黄嘌呤与胸苷
DMSO	dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
NC	nitrocellulose	硝酸纤维素
UTR	untranslated region	非翻译区

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
cDNA	complement DNA	互补脱氧核糖核酸
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
IFN- $\gamma$	interferon-gamma	$\gamma$ -干扰素



# 目 录

第一章 绪 论 .....	1
1.1 猪瘟病毒的分子生物学研究进展 .....	1
1.1.1 猪瘟病毒的形态及理化特性 .....	1
1.1.2 猪瘟病毒的基因组结构 .....	2
1.1.3 猪瘟病毒的侵入及复制 .....	3
1.1.4 CSFV 的编码蛋白及其功能 .....	4
1.1.5 CSFV非编码区的结构与功能 .....	8
1.1.6 猪瘟病毒的生物型 .....	9
1.1.7 猪瘟病毒的遗传分型 .....	10
1.2 单克隆抗体在CSFV研究中的应用 .....	11
1.2.1 McAb在CSFV鉴别诊断方面的应用 .....	11
1.2.2 McAb在研究CSFV抗原和蛋白结构间关系方面的应用 .....	11
1.2.3 McAb在鉴定CSFV保护性抗原蛋白方面的应用 .....	12
1.2.4 McAb 在研究 CSFV 抗原变异方面的应用 .....	12
1.2.5 McAb 在 CSFV 蛋白质抗原表位研究方面的应用 .....	13
1.3 本研究的背景与目的 .....	14
第二章 猪瘟病毒弱毒 E2 基因的克隆及表达 .....	16
2.1 材料与方法 .....	16
2.1.1 毒株、菌株与质粒 .....	16
2.1.2 工具酶及试剂 .....	16
2.1.3 主要实验仪器 .....	17
2.1.4 引物的设计与合成 .....	17
2.1.5 病毒 RNA 提取 .....	17
2.1.6 CSFV tE2 基因片段的 RT-PCR 扩增和克隆 .....	17
2.1.7 表达载体的构建与鉴定 .....	18
2.1.8 蛋白的诱导表达及纯化 .....	18
2.1.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) .....	19
2.1.10 酶联免疫吸附试验 (ELISA) .....	19
2.1.11 Western blotting 分析 .....	19
2.2 结果 .....	20
2.2.1 tE2 基因片段正确插入表达载体中 .....	20
2.2.2 重组蛋白获得高效表达 .....	21
2.2.3 重组蛋白能被猪瘟病毒特异性血清所识别 .....	22
2.3 讨论 .....	23
第三章 针对猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备 .....	24
3.1 材料与方法 .....	24
3.1.1 细胞、实验动物及试剂 .....	24
3.1.2 试剂配制 .....	24
3.1.3 抗原的制备 .....	25
3.1.4 动物免疫 .....	25
3.1.5 细胞融合 .....	25

3.1.6	阳性杂交瘤细胞的筛选.....	26
3.1.7	阳性杂交瘤细胞的纯化.....	26
3.1.8	单克隆抗体的大量制备.....	27
3.1.9	ELISA .....	27
3.1.10	免疫过氧化物酶单层试验 ( IPMA ) .....	27
3.1.11	Western blotting 分析 .....	28
3.1.12	单克隆抗体的亚型鉴定.....	28
3.2	结果.....	28
3.2.1	筛选出一株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞.....	28
3.2.2	单克隆抗体能与免疫原发生特异性反应.....	28
3.2.3	单克隆抗体能与猪瘟病毒发生特异性反应.....	29
3.2.4	单克隆抗体能够识别杆状病毒表达的重组 E2 蛋白 .....	31
3.2.5	单克隆抗体属于 IgG1 亚型 .....	32
3.3	讨论.....	32
第四章	结 论 .....	34
参考文献	.....	35
致 谢	.....	42
作者简历	.....	43

## 第一章 绪 论

### 1.1 猪瘟疫病毒的分子生物学研究进展

猪瘟 (classical swine fever, CSF; hog cholera, HC) 是猪的一种致死性传染病。其致病病原属黄病毒科 (*Flaviviridae*) 瘟病毒属 (*Pestivirus*) 的一个成员 (Wengler et al, 1995), 与牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和羊边界病病毒 (BDV) 关系极其密切。有关CSF的确切起源尚不清楚, 不过推测最早关于该病的记录是1833年在美国中西部的俄亥俄州, 但Hanson (1957) 对此种推测进行了澄清, 认为俄亥俄州的该病暴发记录仅仅是19世纪早期在美国众多暴发病例中的一次 (Hanson et al, 1957)。实际上早在1822年法国就有类似CSF的流行 (Cole et al, 1975)。因猪瘟具有高度接触传染性和巨大的经济破坏力, 世界动物卫生组织 (Office International des Epizooties, OIE) 将其列为A类传染病 (International Animal Code, 1998)。A类传染病是指病症特别严重、传播迅速、无国界, 能造成巨大的社会经济损失和严重公共卫生问题, 对动物及其产品国际贸易有严重影响, 按照“国际动物卫生法 (International Animal Health Code)”必须呈报OIE的传染病。

CSFV是一种具有世界影响的猪的病原体, 自从20世纪初期CSFV被证明是一种滤过性病原后, 一直倍受关注, 其对养猪业的破坏性和对经济的影响也始终是对其进行研究的一个刺激因素。由于CSFV难于操作, 因此, 只有在开发和利用了尖端的病毒学研究方法后对其研究才能取得较大进展, 特别是在过去的十几年中, 关于病毒粒子的许多细节一直都不清楚。近年来在CSFV的研究方面取得了一些进展, 但是仍有一些大家都很关注的问题, 如毒力的分子标记、非结构蛋白的功能作用细节等远未研究清楚。

#### 1.1.1 猪瘟病毒的形态及理化特性

由于CSFV在细胞培养物中增殖的滴度相当低, 病毒粒子易碎并具有囊膜, 因此用传统的方法包括密度梯度离心来进行纯化是很困难的。关于病毒粒子的形态和大小众说不一, 目前比较一致的说法是, 完整的病毒粒子呈球形, 直径约为30~70nm, 具有囊膜, 表面有不规则形状的纤突。病毒粒子的内部含有40nm的电子致密的核衣壳, 似乎呈六角形 (李成等, 1989; 王镇等, 2000)。

病毒在CsCl中浮力密度为 $1.16\text{g}/\text{cm}^3$ , 沉淀常数 $S_{20w}$ 为140~150, 在蔗糖密度梯度中的浮力密度为 $1.15\sim 1.16\text{g}/\text{cm}^3$ , 等电点为4.8。在实验条件下, CSFV很稳定, 但温度对培养上清中病毒的活性有很大影响, 病毒粒子在50℃可存活3天, 37℃可存活7天, 在-70℃可存活多年 (约4年) 而其感染性丧失不明显, 在冻肉中可存活至少2个月, 60℃以上持续60min才能

保证完全破坏血清、血液和尿液中的病毒 (Harkness et al, 1985)。病毒在pH5-10时稳定,但在pH3时迅速失活,脱纤血中的病毒在pH5-5.5时最稳定 (Kabin et al, 1967)。乙醚、氯仿、去氧胆酸盐、诺乃洗涤剂P40和皂角素等可使其迅速失去感染性 (Liess et al, 1973; Moenning et al, 1988; Russell et al, 1987)。病毒对胰蛋白酶中度敏感,对二甲基亚砷稳定,故将其用于CSFV的冻存保存。前列腺素A1能抑制CSFV的增殖,50 $\mu$ g/mL浓度能抑制99%病毒的生成 (Freitas et al, 1998)。CSFV的自然宿主是猪和野猪,不能凝集鸡、豚鼠、猪、牛和人的红细胞。CSFV可在猪的骨髓、睾丸、肺、脾和肾的细胞培养物及白细胞中繁殖,最常用的是PK15, SK6和CPK细胞系,其中最易感的是PK15, PK-2a和ST等几株猪肾和猪睾丸细胞系 (Moenning et al, 1992)。

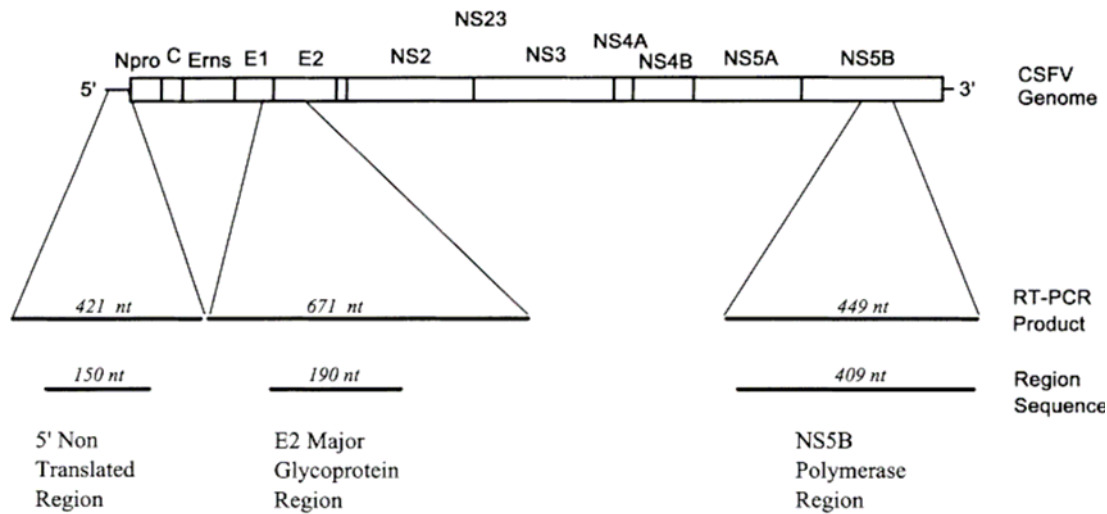
### 1.1.2 猪瘟病毒的基因组结构

CSFV的基因组为单股正链RNA,长约12.3kb (Meyers et al, 1996; Moormann et al, 1996; Ruggli et al, 1996), 5'端无帽子结构, 3'端也没有多聚腺苷酸 (Poly A) 尾。含有一个大的开放性读码框 (ORF), 由其编码一条约3898个氨基酸的多聚蛋白, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的作用下, 多聚蛋白在翻译和翻译后加工过程中形成12种成熟的病毒蛋白, 在聚蛋白上从N端到C端的顺序依次为: N<sup>pro</sup>、C、E<sup>ms</sup> (E0)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B (图1-1), 其中N<sup>pro</sup>、C、E<sup>ms</sup>、E1、E2、p7、NS2对于CSFV RNA的复制是必不可少的 (Meyers et al, 1989; Moormann et al, 1990)。

编码CSFV结构蛋白的基因主要定位于基因组5'端三分之一部分, 包括p14核衣壳蛋白C和3种囊膜糖蛋白 (gp): E<sup>ms</sup> (gp44/48)、E1 (gp33) 和E2 (gp55)。CSFV的ORF有8种非结构蛋白 (N<sup>pro</sup>、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B), 除N<sup>pro</sup>外, 编码其他非结构蛋白的序列定位于CSFV基因组3'端三分之二部分 (Elbers et al, 1996; Meyers and Thiel, 1996)。大多数非结构蛋白的功能目前还不是很清楚。猪瘟病毒基因组非编码区在病毒基因组复制和多聚蛋白翻译过程中起着重要的作用, 是病毒基因组RNA复制和病毒蛋白表达的主要调控区。5'UTR是病毒蛋白表达的主要调控区 (Moormann et al, 1990; Ishidawa et al, 1995; Lowings et al, 1994), 而3'UTR则是病毒RNA复制的重要调控区, 可能含有起始基因组RNA合成的启动子、增强子等顺式作用元件。

通过测定CSFV 4种结构糖蛋白的N端, 确定E<sup>ms</sup>、E1、E2的N端分别位于氨基酸残基Glu268、Leu495和Arg690。结构蛋白的加工是由宿主细胞的信号酶介导的, 蛋白酶首先在核衣壳蛋白C和E<sup>ms</sup>12前体之间剪切聚蛋白, 随后在E2的C端切开, 最后E<sup>ms</sup>12被迅速剪切成E<sup>ms</sup>1和E2。在E2从E<sup>ms</sup>12前体释放后, E<sup>ms</sup>1被加工成E<sup>ms</sup>和E1, 最后这三种囊膜糖蛋白通过分子内或分子间二硫键形成复合物 (Rumenapf et al, 1998)。CSFV基因组ORF的两侧的非翻译区 (NTR), 存在一段17个核苷酸的互补序列, 在CSFV种内是非常保守的。在5'NTR上含有多个AUG密码子和一个高度结构化的核糖体进入位点 (IRES)。IRES长约330nt, 其5'边界位于核苷酸28~66nt之间, 这些核苷酸形成一个茎环结构 (发卡B), 该结构可能对于

IRES的活性十分重要 ( Rijnbrand et al , 1997 )。



CSFV 基因组结构示意图

1.1.3 猪瘟病毒的侵入及复制

CSFV主要是经口腔粘膜等途径侵入动物机体，由于对淋巴网状内皮细胞具有特殊嗜性，因此，侵入机体后，首先感染扁桃体隐窝上皮细胞，然后侵入其下层的淋巴网状组织而扩散到周围的淋巴组织。病毒在局部淋巴结进行复制后，再传到外周血液，此时病毒在脾脏、骨髓、内脏淋巴结以及连接小肠的淋巴样结构中大量增殖，最后病毒才可能侵入实质器官、呼吸器官和中枢神经系统 ( Trautwein et al , 1988 )。

CSFV进入细胞是通过其囊膜糖蛋白 $E^{ms}$ 和E2与细胞表面的相互作用来完成的。利用在昆虫细胞中表达的 $E^{ms}$ 和E2蛋白进行的抑制试验表明， $E^{ms}$ 和E2作用于不同的细胞表面成分，CSFV最先通过 $E^{ms}$ 结合到细胞上 ( Hulst et al , 1997 )。在体外CSFV感染培养的猪肾细胞时，在细胞上传代引起 $E^{ms}$ 蛋白C端476位的Ser氨基酸残基突变为Arg残基，这一改变使得不依赖硫酸乙酰肝素 ( HS ) 的病毒变为利用HS作为 $E^{ms}$ 受体的病毒，病毒通过其 $E^{ms}$ 和细胞表面的HS的相互作用完成最初的结合。

病毒进入细胞及随后其RNA从核衣壳中释放的机制尚不清楚。病毒基因组RNA从核衣壳中释放出来后，作为信使RNA。一方面，病毒的(+)RNA在病毒编码的复制酶( 依赖于RNA的RNA聚合酶 ) 作用下，合成负链RNA ( (-)RNA )，即形成(+)RNA和(-)RNA共价连接的双链RNA中间体，然后再以(-)RNA为模板合成子代基因组RNA ( 殷震等，1997 )。另一方面，病毒利用宿主细胞的核糖体和细胞因子起始病毒蛋白的合成。由于缺乏5'帽子结构，CSFV基因组以一种不依赖5'帽子结构的、IRES介导的机制进行翻译，其5'NTR能够驱动下游蛋白翻译的起始，且不依赖功能性真核起始因子eIF-4F。IRES通过征集一个核糖体43S前起始复

合物直接到起始密码子介导翻译的内部起始。在该过程中, 关键的反应是核糖体40S亚单位直接结合到IRES上, 形成稳定的双复合物。在该复合物中, 起始密码子被精确定位到核糖体的P位点。起始密码子旁边残基363~391与核糖体的精确结合有关。CSFV翻译起始点上游区域形成一个RNA伪结构, 茎II的形成对于CSFV的IRES是必需的, 破坏伪结构的1b螺旋后核糖体不能与之结合, IRES不能介导翻译的启动。III<sub>d</sub> 1区域残基的突变和III<sub>a</sub>区域结构的破坏均会严重减少或阻碍核糖体的结合 (Rumenapf et al, 1993)。真核起始因子3 (eIF-3) 能特异地结合到CSFV的IRES, 并在CSFV翻译的起始过程中发挥着必不可少的作用。eIF-3特异地与CSFV的IRES的III区的顶茎III<sub>b</sub>上的一个内部膨胀部发生反应, eIF-3能够以一种序列或结构特异的方式与真核mRNA结合, eIF-3的10个亚单位中的一个或多个可能决定这些反应 (Sizova et al, 1998)。在CSFV 5'NTR的IRES后, 核糖体对起始密码的扫描被限制在一个小的区域, 位于聚蛋白起始位点上游7个核苷酸的AUG密码子在瘟病毒中是保守的, 不能用来启动翻译, 在聚蛋白起始位点下游插入的AUG也不能被核糖体作为起始位点加以识别。CSFV的IRES要求AUG密码子的下游没有稳定的二级结构。起始密码子下游稳定的二级结构抑制翻译的内部起始, 但在有hpCAT的情况下, 不会减少RNA结合到纯化的40S核糖体亚单位上的能力。5'端蛋白编码区内稳定的RNA结构不会改变IRES与40s核糖体亚单位形成起始接触的能力, 但反过来会阻止随后40s核糖体亚单位和起始密码子附近内部核糖体有效进入所要求的病毒RNA与40s核糖体亚单位之间反应的形成 (Rijnbrand et al, 2001)。由于CSFV基因组RNA只有一个开放性阅读框 (ORF), 因此, CSFV在感染细胞内从其ORF的单一翻译起始点开始, 表达一条含3898个氨基酸残基的多聚蛋白, 然后在翻译的同时或翻译后, 在病毒编码的蛋白酶和宿主蛋白酶作用下, 被加工为成熟的病毒蛋白, 包括结构蛋白和非结构蛋白 (Rumenapf et al, 1993)。目前, 对衣壳蛋白的研究比较清楚, Thiel等 (1991) 研究发现核衣壳蛋白在合成几分钟内便与病毒基因组RNA结合而包装进入核衣壳。E2-E2、E2-E<sup>ms</sup>及E2-E1之间由二硫键 (或某些较强的非共价键) 连接成同源或异源二聚体, 构成病毒的囊膜蛋白, 因此, 二聚体化可能在病毒的装配中很重要。E2, E1的C端有疏水性氨基酸组成的结构, 可作为跨膜结构域, 使之镶嵌于CSFV囊膜脂质双层中, E<sup>ms</sup>无此疏水结构, 它与病毒粒子的联系尚不清楚, 可能与E2形成异源二聚体, 但这种结合不如E1和E2那样牢固 (Schneider et al, 1993)。外膜蛋白糖基化后, 通过内质网和高尔基体搬运到胞浆膜, 成为一种跨膜蛋白。应用电镜超薄切片技术对感染细胞中病毒的形态发生进行观察的结果显示, CSFV在胞内增殖的主要部位位于有丰富膜系统的细胞核周围。成熟的病毒粒子多见于细胞质中充满无定型基质的囊膜中, 有时可观察到囊膜在质膜处的开口以及周围的无定型基质和其中的成熟病毒, 提示CSFV可能通过这一特殊的结构向外释放, 且多数释放的病毒依然吸附在无定型基质中。

#### 1.1.4 CSFV 的编码蛋白及其功能

囊膜糖蛋白则是在C-E<sup>ms</sup>-E1-E2前体的基础上, 由定位于宿主细胞内质网和高尔基体上

的信号肽酶、蛋白水解酶以及糖基化酶的作用下加工成熟的。E2首先从前体蛋白中被切割出来,随后 $E^{ms}$ -E1被加工成 $E^{ms}$ 和E1 (Rumenapf et al, 1993) 这三种囊膜糖蛋白通过分子内或分子间二硫键形成同源或异源二聚体,成熟的糖蛋白被运送到宿主细胞的细胞膜上。

核衣壳蛋白C 分子量为14kDa,是一种结构蛋白,由CSFV聚蛋白上Ser169~Ala267之间的氨基酸组成,其主要区域在瘟病毒中极为保守,同源性可达91%以上,其N端由 $N^{pro}$ 水解作用产生,而C端可能由宿主细胞的信号肽酶作用所产生 (Fryxell et al, 1995),C蛋白在合成后几分钟便与基因组RNA相结合,包装形成核衣壳。该蛋白与黄病毒的核衣壳蛋白相似,富含碱性氨基酸。对于C蛋白的研究较少,由于其与基因组RNA结合,故推测它可能充当基因转录的调控因子 (Rumenapf et al, 1993)。其基本功能是为病毒基因组提供一个保护屏障,其抗原表位对T、B细胞介导的免疫反应至关重要,因此可能是宿主细胞免疫反应的重要靶蛋白,但CSFV C蛋白基因构建的重组痘苗病毒活载体疫苗免疫猪,并不能保护猪免受强毒的攻击,不能诱导机体产生中和性抗体 (Gachhui et al, 1997)。

在病毒粒子中, $E^{ms}$ 以同源二聚体的形式存在,分子量约100kDa,其相应单体由227个氨基酸组成,分子量为44~48kDa。 $E^{ms}$ 上缺乏膜锚定结构,以一种尚不清楚的机制与囊膜相连,感染CSFV的细胞分泌大量的 $E^{ms}$ 到培养液中 (Rumenapf et al, 1993)。 $E^{ms}$ 能够刺激机体产生中和性抗体,并获得对CSFV的免疫力。 $E^{ms}$ 还是一种尿嘧啶特异的核酸酶,具有RNase活性,属于细胞外RNase家族。该RNase家族由几种真菌和植物的RNase组成,这些酶有两个长均为8个氨基酸的同源区域,两个区域之间被38个非同源的氨基酸分隔开,两个区域中氨基酸残基之间强的相互作用可能参与形成 $E^{ms}$ 的活性区,在这两个区域中的组氨酸似乎是其酶催化活性所必需的。Hulst等 (1998) 通过定点突变技术将C-株病毒 $E^{ms}$ 区域中的His346和297突变为Lys后,得到的突变病毒的 $E^{ms}$ 蛋白虽然仍能与 $E^{ms}$ 特异性的中和性单抗及多抗反应,也能抑制CSFV感染SK6细胞,但却丧失了其核酸酶的活性。这种突变后的病毒在培养细胞上表现出与其父母代病毒相似的生长情况,但不同的是这种RNase阴性病毒能够诱发感染的猪肾细胞出现细胞病变,进一步的研究证实,这种致细胞病变效应是其固有的特性,对其感染的猪肾细胞的DNA分析表明,病毒诱发了细胞的凋亡。上述结果表明,囊膜糖蛋白 $E^{ms}$ 的RNase活性在CSFV的复制中发挥着重要作用,可以推测这种RNase活性可能与CSFV在其自然宿主中的持续性感染有关 (Ulst et al, 1998)。在体外免疫抑制试验中, $E^{ms}$ 不仅能够完全抑制由刀豆蛋白A诱导的猪、牛、羊和人的淋巴细胞增殖,而且还能强烈抑制不同种属动物淋巴细胞的蛋白质合成,并不破坏其细胞膜,表明 $E^{ms}$ 能够诱导这些种属动物的淋巴细胞的凋亡。由于CSFV感染以白细胞减少和免疫抑制为特征,因此 $E^{ms}$ 可能在CSFV的致病性方面发挥着重要的作用 (Bruschke et al, 1997)。Meyers等 (1999) 通过定点突变技术替换或缺失了 $E^{ms}$ 其RNase活性区中的His346和/或297后,所得到的RNase阴性病毒均被致弱,其中所有His346受到影响的突变病毒的致病性完全丧失,而那些仅His297发生改变的病毒感染动物,在持续出现几天临床症状后,即迅速恢复 (Meyers et al, 1999)。 $E^{ms}$ 具有高的热稳定性,50-60 为最适温度,其最适pH为6.0~6.5,与其它RNase相似。 $E^{ms}$ 的RNA酶活性不受 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、EDTA和RNase的影响, $Mn^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 为其强的抑制剂。刘湘涛等 (2000)

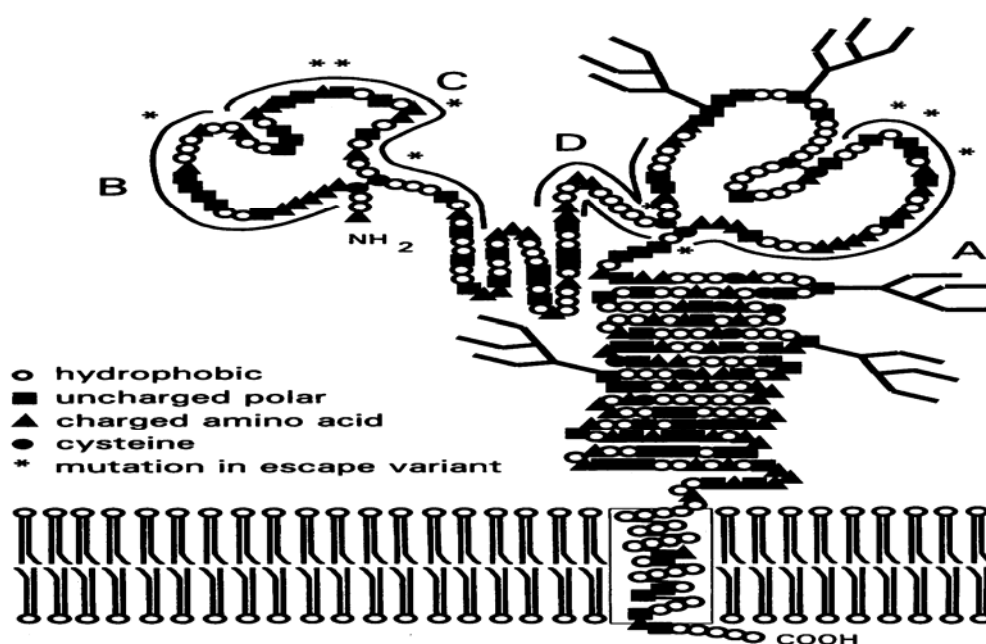
也对我国流行毒株的Ems进行了序列分析,在此基础上试图利用重组技术研究其生物活性,以进一步阐明CSFV的致病机制(刘湘涛等,2000)。

囊膜糖蛋白E1,即gp33,是CSFV最小的囊膜糖蛋白,在病毒粒子中位于囊膜中部并与E2形成异源二聚体,是唯一不能产生中和抗体的糖蛋白(Stark et al,1993)。E1的N端为Leu495,C端为Gly689,由195个氨基酸残基组成,未修饰前的分子量为21.8kDa,内有3个N连接的糖基化位点,修饰后分子量为33kDa,E1的蛋白骨架中有两段疏水序列,Leu548~Pro579和Thr659~Gly689,在聚蛋白转位过程中,前一段序列是前体蛋白向内质网腔转位的终止信号,后一段则充当E1转位的信号肽。另外这两段疏水区还充当E1的膜锚定位点。在CSFV感染细胞的抽提物中,它常与E2以异源二聚体的形式免疫共沉淀。E1不诱导产生中和抗体,到目前为止还未发现病毒免疫血清中有抗E1的抗体,而E1的作用可能是通过与E2形成复合抗原结构才得以发挥。在病毒中,E1/E2复合物也可能是稳固病毒颗粒构型的主要结构蛋白,并起到稳固E2穿膜的作用。

E2,又称为gp55,是CSFV的主要保护性抗原蛋白,其在猪瘟病毒多聚蛋白上的位置始于氨基酸残基690,终止于氨基酸残基1060,长约370个氨基酸。在靠近E2 N端上游有一段信号肽序列,在其C端有一段跨膜区,氨基酸残基1032~1048之间有一亲水序列。利用单抗原竞争结合和抗原捕捉实验对E2蛋白的抗原结构分析的结果表明,E2蛋白上存在4个抗原区,即A-D,所有这4个区均位于E2蛋白N端氨基酸残基690-866之间,而C端氨基酸残基866~1007之间的部分都不是其抗原表位必须的,不参与这些表位构像的形成,因此氨基酸残基690-866的部分似乎是E2蛋白最具抗原性的部分(Wensvoort et al,1989)。在E2蛋白的4个抗原区中,A和D抗原区位于B和C抗原区的羧基端,其中A抗原区又分为A1、A2和A3三个亚区。在E2蛋白上,仅A1和A2抗原亚区是保守的,A3抗原亚区、B、C和D抗原区均为非保守的抗原区。A1抗原亚区、B和C抗原区是中和性抗原表位区,抗A1亚区的单抗和抗B区或抗C区的单抗之间具有协同中和作用(van Rijn et al,1993)。利用瞬时性表达的CSFV Brescia株的E2蛋白缺失突变体对E2蛋白上各抗原表位区进行的定位分析表明,A抗原区位于氨基酸残基766-866之间,高度保守的氨基酸残基795~851之间的区域则很可能是极其保守的A1/A2亚区所在的区域,而非保守的A3亚区位于氨基酸残基766-813之间的区域。B区位于氨基酸残基690~733之间的区域,C区可能位于氨基酸残基690-800之间,D抗原区位于氨基酸残基766~800之间。E2蛋白总共有15个半胱氨酸(Cys),其中N端部分的6个Cys对于E2蛋白的正确折叠十分关键,C端的Cys的缺失不影响中和性单抗的结合,表明这些Cys不参与形成N端部分表位的构像。将N端部分的6个Cys定点突变的结果表明,695位和737位的Cys对于B和C抗原区的中和性单抗的结合是必需的,它们极有可能形成这两个抗原表位区的一个二硫键,氨基酸残基792、818、828和856位的Cys似乎对于大多数A和D抗原区的中和性单抗的结合是必需的,将其替换后影响A和D抗原区的中和性单抗的结合,但不影响B和C抗原区单抗的结合,表明这4个Cys对于A和D抗原区的构像是重要的。在此基础上,van Rijn等于1994年提出了一种E2蛋白的可能的结构模型,根据该模型,E2蛋白具有抗原性的部分形成两个相对独立的结构单位,一个由B和C抗原区组成,另一个由高度保守的A和D抗原区组成。B和



C抗原区组成的结构单位通过最靠近N端的Cys693和Cys737之间的二硫键连接，A和D抗原区组成的结构单位可能通过第792和856、818和828位的半胱氨酸之间形成的两对二硫键连接。两个结构单位均含有中和性表位，并且这些中和性抗原表位是构像依赖型的（van Rijn et al, 1994）。在E2的羧基端存在一个线性表位，氨基酸残基995~998位的YYEP是其核心序列，这一表位在瘟病毒属的三个不同成员中是高度保守的。Lin等（2000）通过缺失分析确定了E2蛋白上的另一个线性表位TAVSPTTLR，其在E2蛋白上的位置位于氨基酸残基829-837之间，并且这一序列在CSFV毒株中是极其保守的，而在BVDV和BDV毒株中差异极大，这为设计含有该表位的肽并将其应用在CSFV的检测和鉴定提供了有用的信息。同时还确定了能与CSFV感染猪多克隆IgG结合的最小的E2抗原区域，该抗原区域位于E2 N端23个氨基酸残基内（氨基酸残基690~812），这一区域能消除或减少同其它瘟病毒的交叉反应，这样就能够用在CSFV的血清型检测方面（Lin et al, 2000）。E2蛋白还是CSFV吸附和进入敏感细胞所必需的，中和抗体直接和E2蛋白上的表位反应。最近的研究表明，CSFV E2糖蛋白是猪瘟病毒对猪的毒力相关基因（Risatti et al, 2005），研究人员为了研究CSFV E2基因在猪瘟病毒致病性中的作用，将CSFV CS株（弱毒）的E2基因与Brescia株（强毒）的E2基因互换，结果发现嵌合的Brescia株对猪的致病力明显减弱：表现为扁桃体病毒毒价大大减少、一过性病毒血症等；嵌合的CS株仍然保持了弱毒性。



CSFV E2 蛋白的空间结构示意图  
Proposed antigenic structure of CSFV envelope glycoprotein E2

在CSFV的非结构蛋白中，N<sup>pro</sup>是CSFV自身的蛋白酶，由其聚蛋白开放性读码框的5'端编码，长约168个氨基酸，其C端切点位于聚蛋白上的氨基酸残基Cys168和Ser169之间，这两个位置的氨基酸在瘟病毒中是保守的。由于N<sup>pro</sup>在病毒聚蛋白中位于核衣壳蛋白C的5'端，

所以C蛋白的氨基端是在剪切的基础上产生的。在病毒体系中,  $N^{pro}$ 是一种新型的半胱氨酸蛋白酶, 以前还从未发现过这一类型的酶, 但该酶与类枯草杆菌蛋白酶有些相似, 这种蛋白酶被称为前导蛋白酶, 属于蛋白酶中的木瓜蛋白酶家族。以鼠的泛素基因替换编码 $N^{pro}$ 的基因序列而得到的重组病毒, 在SK6细胞上具有与原始病毒基本相同的复制能力, 表明至少在细胞培养方面,  $N^{pro}$ 的基因产物除在其C端自身剪切产生病毒核衣壳蛋白的N端这一功能外, 无其它病毒复制必需的功能。当将 $N^{pro}$ 基因大部分缺失后分离不到存活的病毒, 因此形成正确的核衣壳蛋白的N端可能对于CSFV的复制是必须的 (Tratschin et al, 1998)。现已确定 $N^{pro}$ 上的Cys69和His49与其蛋白水解作用有关, 这支持了 $N^{pro}$ 很可能是一种半胱氨酸蛋白酶的假设, 但参与催化水解的His49的位置与类木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白酶不相符, 在类木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白酶中, 该组氨酸位于参与催化作用的半胱氨酸蛋白酶的C端。

除了 $N^{pro}$ 外, CSFV还编码7种非结构蛋白, 分别是p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B, 它们在RNA复制的多步催化反应中发挥着关键作用 (Behrens et al, 1998)。非结构蛋白中研究较多的是NS2-3和NS5B。NS2-3是一种免疫优势蛋白, 所有感染动物均产生抗NS2-3的抗体, 但这种抗体不具有病毒中和性。NS2-3蛋白是一种双功能蛋白, 具有丝氨酸类蛋白酶活性和核苷酸酶活性及解旋酶活性, 其解旋作用依赖于CSFV特异的单链RNA, 该蛋白在病毒的生命周期中至关重要 (Warrener et al, 1995; Wisketchen et al, 1991); NS3蛋白还与CSFV的致细胞病变有关, 在致细胞病变的CSFV细胞培养物中, NS3的表达量明显增多; NS2蛋白在RNA的复制方面具有调控功能, 不过这种功能不是必需的 (Moser et al, 1999)。NS5B分子量约为77kDa, 是病毒编码的依赖于RNA的RNA聚合酶, 参与病毒基因组RNA的复制 (Steffeus et al, 1999)。

### 1.1.5 CSFV 非编码区的结构与功能

CSFV的5'UTR由360-373个核苷酸组成, 是CSFV基因组高度保守的区域。不仅在基因组的复制, 而且在多聚蛋白的表达中也具有重要的调控作用。利用FOLD软件, 研究者建立了CSFV 5'UTR的二级结构模型 (Brown et al, 1992; Deng and Brock, 1993), 模型显示, 5'UTR由一系列的茎一环结构组成, 可分为A、B、C、D四个功能区。在A区, 5'UTR前9个碱基在CSFV中最为保守, 并与下游序列形成一个茎一环结构, 推测此结构在复制中具有重要作用。D区约占5'UTR序列的2/3, 具有保守的二级结构甚至三级结构。整个非编码区中含有多个不能启动翻译的隐性ATG起始密码子, 对多聚蛋白的翻译由其中的IRES介导。CSFV的IRES 5'端边界位于5'UTR中28-66位核苷酸之间 (B区), 真核生物核糖体与IRES的结合直接起始聚蛋白的翻译, 这是一种完全不同于核糖体扫描模式的翻译机制, 目前认为这一过程不需要真核启动因子eIF-4F的参与 (Rijnbrand et al, 1997)。1995年, Lea等人提出IRES与宿主核糖体的结合是以碱基配对模式进行的, 18S rRNA 3'端保守序列可与起始密码子上游一段假节结构中单链核苷酸配对, 被结合的核糖体对起始密码子的扫描被限制在一个小

的区域内,在此过程中,真核起始因子eIF3特异性地结合到CSFV的IRES,并在CSFV翻译起始过程中起着必不可少的作用(Lea et al, 1995)。

CSFV的3'UTR由226~243个核苷酸组成,在同属病毒内具有较高保守性。3'UTR中存在一个可变区和一个保守区,可变区位于5'端,在3'端约100个碱基具有高度的保守性,推测此保守区在病毒复制中发挥重要作用,利用生物信息学研究方法所发现的复制起始位点正位于其中(肖明等,2001)。对多株CSFV的3'UTR序列比对和结构分析发现,在可变区内具有插入序列是疫苗株重要特征之一(Wu et al, 2001)。按照插入序列的不同,可以将疫苗株分成两种类型Group 1和Group 2。Group 1在3'UTR第62位有富含T的12~14个连续核苷酸的插入CTTTTTT(TT)CTTTT, Group 2类型的疫苗株在3'UTR可变区第119位有12个连续核苷酸的插入TATTTATTTATC,两种类型的疫苗株在地理分布上还具有明显的区域性:Group 1主要是来源于中国的疫苗株,而Group 2的疫苗株均与俄罗斯有关。对比疫苗株和强毒株3'UTR的RNA二级结构发现,疫苗株在3'UTR的连续插入使得在该区域形成一个大的突出的环结构,推测其对疫苗株的复制起始和复制量产生了影响,从而使疫苗株病毒的滴度低于强毒株。当然已报道的疫苗株中,也有有的在3'UTR没有上述特征性插入的,这些疫苗株的减毒或致弱机制可能另有未知的、更为复杂的原因。目前有研究表明,NS5B作为一种RNA依赖的RNA聚合酶能够与3'UTR结合,参与CSFV基因组的复制;体外研究证明3'UTR中CCCGG和CATATGCTC是NS5B结合并启动病毒RNA合成所必需的,当两段序列缺失时NS5B即失去结合功能和起始RNA合成的活性(Xiao et al, 2004)。

#### 1.1.6 猪瘟病毒的生物型

根据各毒株在组织培养时有无细胞病变,CSFV被分为两种生物型,即致细胞病变(CP)和非致细胞病变型(nCP)病毒。nCP型病毒在细胞中复制不会对宿主细胞造成明显的破坏,而CP型病毒则会破坏所感染的细胞,使其产生细胞病变(Gallei et al, 2005)。

血清学分析和序列比较表明,CP型病毒是nCP型病毒经过突变产生的,大多数情况下与RNA的重组有关。大部分CP型病毒分离株的基因组含有病毒序列的不同重排和宿主细胞序列的插入。另外,特殊病毒集落中亚基因组(sg)RNA缺陷性病毒颗粒的存在也是产生CP型病毒的一个原因。虽然CP型病毒引起细胞产生细胞病变的机制尚不清楚,但可以肯定病毒的非结构蛋白NS3在这一过程中起着关键的作用,因为NS3在CP型病毒中的表达大大高于nCP型毒株(Meyers et al, 1995; Meyers et al, 1996; Thiel et al, 1993),虽然NS3本身可能不足以引起CPE,但诱导CPE可能需要细胞内NS3的浓度达到一个阈值(Moser et al, 1999)。尽管NS3不是CSFV RNA复制必需的,但缺失NS3基因可使病毒产生致细胞病变效应,这表明NS3具有调控功能,在nCP型病毒中NS2蛋白可能起着防止导致细胞死亡的病毒RNA和蛋白不受控制地累积,缺失了NS2基因的CP型病毒的复制更加有效并表达大量的NS3蛋白。 $E^{ms}$ 的RNA酶活性可能是维持CSFV非细胞致病性所必需的,因为其RNA酶活性丧失的病毒使其感染的宿主细胞产生了细胞病变。用CSFV持续感染猪肾细胞能够自发产生

含sgRNA的缺陷性病毒颗粒，从而产生致细胞病变的毒株，而被其感染的一些细胞在经历CPE后能够存活下来，并能进一步传代，这些细胞保持了病毒抗原阳性，并不断地向胞外释放出完整的病毒粒子，释放的病毒中大多数情况下含有缺陷性病毒粒子。利用从这些细胞中得到的不含sgRNA的病毒持续感染后的细胞，即使用CP型CSFV超量感染也不出现细胞病变，这些观察的结果表明，经历CPE后存活下来的细胞中所含的病毒能够使其感染的宿主细胞获得抵抗CSFV诱导CPE的能力，进一步研究揭示，这种保护作用是通过突变病毒下调sgRNA的复制介导的（Mittelholzer et al, 1982）。

### 1.1.7 猪瘟病毒的遗传分型

CSFV可能是瘟病毒中最不易发生变异的，不过利用单抗和一些有限的分子对其进行分型表明，CSFV可以进一步分为不同的群和亚群，其中区分最明显的是在古典毒株和最新毒株之间。病毒亚型的鉴定将会增进对CSFV进化和流行的了解，并可能得出其生物学特性和毒力的差异。

技术的进步，使得在确定和比较病毒基因组片段的核苷酸序列的基础上进行病毒的遗传分型已很容易，可以用这种方法来建立不同病毒分离株之间的联系，这对于分类很有用，而且能够帮助追踪病毒传播的类型，发现防控策略中薄弱环节。遗传分型可以对造成病毒持续性感染和传播的可能原因进行评估。对分离自一系列暴发区域、具有相互联系的毒株的遗传比较可使对于遗传分型的理解更加有效，并可确定病毒在自然界突变的速率。遗传分型已被证实是一种追踪CSFV传播的极为有用的方法，一般认为要优于抗原比较的方法，该方法已被用来证实：（1）病毒从传入地点的散播；（2）在家猪和野猪之间的传播；（3）跨国界传播；（4）关系极其相近的病毒的不同毒力的暴发；（5）特别的变异毒株在本地的持续存在，最可能在感染的野猪；（6）区分野毒株和流行毒株（Hofman et al, 1998；Lowing et al, 1999；Stadejek et al, 1997；Vilcek et al, 1991）。毒株间可能的差异取决于用于比较的基因组的靶区域的长度和变异性。关于基因组的哪一区域应用来进行遗传比较，哪一种比较方法最有意义目前尚有争议。

对不同基因组区域序列比较基础上的CSFV树形关系的研究，将其分为两个主要的基因群（Group 1和Group 2）和另外两个完全不同的分离株（Kanagawa和Congenital Tremor，最近被称为Group 3）。Group 1又进一步分为3个基因亚群（Subgroup），即Subgroup 1.1、Subgroup 1.2和Subgroup 1.3；Group 2也进一步被分为3个亚群，即Subgroup 2.1、Subgroup 2.2和Subgroup 2.3。5'UTR、E2和NS5B基因是CSFV遗传分型时应用最广泛的基因组区域，对这三种分型方法的结果进行分析比较表明，利用NS5B进行遗传分型的可信度最高，而5'UTR的可信度最低（Paton et al, 2000）。

## 1.2 单克隆抗体在 CSFV 研究中的应用

自从1975年单克隆抗体技术的建立 (Kohler and Milstein, 1975), 就以其高度的免疫学特异性和理化同质性, 并且容易大量生产等常规免疫血清无法比拟的优点, 很快成为检测微生物表面抗原位点的最佳生物探针。自1985年Wensvoot等建立了13株猪瘟病毒的单抗以来, 越来越多的抗猪瘟病毒单抗建立了起来, 单克隆抗体不仅在CSFV诊断方面得到广泛应用, 而且也广泛用于CSFV分子生物学研究。

### 1.2.1 McAb 在 CSFV 鉴别诊断方面的应用

虽然与CSFV同属的牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和羊边界病毒 (BDV) 的原始宿主分别是牛和羊, 但猪也可被感染, 血清学上本属内的病毒呈现交叉反应 (Darbyshire, 1960), 给猪瘟的鉴别诊断带来困难。由于猪瘟弱毒疫苗被广泛应用于猪群免疫, 猪瘟强弱毒的鉴别就摆到了我们面前。由于单克隆抗体有识别病毒抗原结构差别的优异功能, 用单克隆抗体区分强弱毒成为CSFV成为可能, 并且取得了突破性进展。Wensvoort等一次制备了13株CSFV Brescia株单克隆抗体, 其中有两株单抗可常规应用于CSFV野毒株, CSFV C株和BVDV感染的鉴别诊断。以后CSFV的许多单克隆抗体相继被建立, Kosmido等 (1995) 人建立了12株抗CSFV E2的McAb和11株的抗CSFV E<sup>ms</sup>的McAb。Weilandt等 (1990) 建立了12株针对CSFV E2的单抗, 其中有10株单抗对被检的126株CSFV分离株全都反应, 且不对瘟病毒属的其它成员有交叉反应。中国兽医监察所王在时和丘惠深 (1995) 运用单克隆抗体技术, 研制成功了猪瘟强弱毒单抗诊断试剂盒, 并在我国猪瘟的诊断实践中取得较大的成功。猪瘟单抗诊断试剂分两种: 一种是鉴别诊断猪瘟强弱毒抗原的单克隆抗体试剂, 另一种是区分猪血清中猪瘟强弱毒抗体的酶联诊断试剂。运用这两种诊断试剂盒不但可以准确地诊断猪瘟, 还可把猪群中潜伏或隐性感染猪检测出来并实行淘汰, 对猪场猪瘟的净化有重大意义。

### 1.2.2 McAb 在研究 CSFV 抗原和蛋白结构间关系方面的应用

目前已经定位的CSFV结构蛋白有四种: C、E<sup>ms</sup>、E1和E2。以McAb为探针进行蛋白结构定位, 通常采用放射免疫沉淀试验 (radioimmunoprecipitation assay, RIA), 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。最早进行这项工作的是Weilandt等 (1990), 借助ELISA试验, 他们发现所用的6株McAb只与融合蛋白E2反应, 而不与融合蛋白E<sup>ms</sup>-E1作用, 随后通过中和试验证明其中5株McAb具有中和活性, 利用其中的两株进行放射免疫沉淀试验, 结果发现这两株McAb不仅可与E2反应, 而且也与E1反应, 由此他们推测这种共沉现象是由于二者间有着紧密联系的缘故。随后的还原与非还原条件下的Western blotting试验进一步证实了以上的推测: 在还原条件下, 抗融合蛋白E2的单抗和抗血

清及抗融合蛋白 $E^{ms}$ -E1的抗血清可区分出E2和E1两条蛋白带，而在非还原条件下则都只有一条约75kDa的蛋白带。至此，可以证明E2和E1之间由二硫键共同形成异源二聚体。随后，Thiel等（Thiel et al, 1991）证明了 $E^{ms}$ 糖蛋白是以同源二聚体的形式存在，他们在进行放射免疫沉淀试验时发现，在还原条件下，只出现了 $E^{ms}$ 蛋白带，而在非还原条件下，只有很少一部分 $E^{ms}$ 出现，倒是在约100kDa处出现一条很宽的反应带，由此，他们推测 $E^{ms}$ 是一个由二硫键构成的同源二聚体，并用双向SDS-PAGE电泳证实了这一推测。同样，Rumenap等（1991）也证明了E2是以同源二聚体的形式存在。

### 1.2.3 McAb 在鉴定 CSFV 保护性抗原蛋白方面的应用

CSFV保护性抗原蛋白既可诱发宿主产生抗病毒的体液免疫反应，又可诱导抗病毒的细胞免疫。目前国外研究表明， $E^{ms}$ 和E2囊膜糖蛋白均可诱发猪产生抗CSFV的中和性抗体。1990年，Weilland等（1990；1992）用6种CSFV McAb测定CSFV的融合蛋白，结果6种单抗均只与E2的融合蛋白反应，其中5种还具有病毒中和活性，这说明E2是一种保护性抗原蛋白。此外，这5种中和性McAb均可与E2蛋白发生沉淀反应。随后又建立了8株抗 $E^{ms}$ 单克隆抗体，其中7株也具有病毒中和活性，且不同的McAb之间具有协同中和作用。这种协同中和作用可将中和能力提高4倍之多。用这些McAb进行胶体免疫电镜试验，表明 $E^{ms}$ 位于病毒粒子的表面。这说明 $E^{ms}$ 的一些抗原表位暴露在外，从而解释了抗 $E^{ms}$ 的McAb为何具有中和CSFV的能力。这一研究明确了 $E^{ms}$ 也是CSFV的一种保护性抗原。

随后的动物实验进一步证实了上述结论。Zijl等以伪狂犬病病毒（PRV）弱毒疫苗为载体，插入E2基因，而Rumenap等（1991）则以痘苗病毒为载体，插入 $E^{ms}$ 基因，二人分别由此构建了重组病毒疫苗，动物接种试验表明，二者均能完全保护猪对同源毒株的攻击。充分证明了 $E^{ms}$ 和E2是CSFV的主要保护性免疫原，可用于研制CSFV基因工程疫苗。

### 1.2.4 McAb 在研究 CSFV 抗原变异方面的应用

CSFV只有一个血清型，用常规血清学方法不可能将从不同地区、不同时间分离的毒株区分开。这说明各种不同CSFV毒株的抗原性差异不大。分析CSFV不同毒株之间微小的抗原差异，目前主要有两个方法：一个是核酸序列分析；另一个就是利用单克隆抗体与不同毒株间的反应性的差别来区分。而单克隆抗体以其高度的特异性和敏感性而在区分不同毒株间的微小抗原差异方面起着重要作用。

Wensvoort等（1989）应用抗CSFV单抗分析了不同来源的94株CSFV的抗原差异。结果发现13株McAb中有7株能识别所有的94株CSFV，说明这7株McAb识别的抗原位点保守。另外6株McAb所能识别的毒株数有差异，说明它们所识别的抗原位点具有变异性。在另外一次实验中，他们用8株中和性McAb与Brescia株感作后，接种PK15细胞，从中得到了11株逃

脱中和作用的CSFV变异株。试验说明单抗是研究病毒抗原变异的重要工具。

为了更加具体地研究CSFV的抗原变异性，Kosmidou等（1995）用12株E2 McAb和11株E<sup>ms</sup> McAb对126株CSFV进行了抗原分型工作。研究结果表明，126株CSFV可被区分为21种不同的反应类型（即不同的抗原型）。用抗E2 McAb的研究结果表明，它们所识别的抗原表位既有保守表位，也有变异表位。而用抗E<sup>ms</sup> McAb的分析结果表明，E<sup>ms</sup>的抗原表位的变异性较大。因为没有一种抗E<sup>ms</sup> McAb能识别所有的毒株。识别谱最宽的一株抗E<sup>ms</sup> McAb也只能识别68%的毒株，有3种抗原型不能被抗E<sup>ms</sup> McAb识别，另外3种抗原型只能被一种抗E<sup>ms</sup> McAb所识别。而所有21种抗原型均可被抗E2 McAb识别，其中抗原性与制备McAb所用毒株差异最大的一型亦可被6种抗E2 McAb所识别。虽然E<sup>ms</sup>是猪瘟病毒的一个比较保守的蛋白，但上述研究结果表明，E<sup>ms</sup>暴露于囊膜外的部分为易变区；此外也说明CSFV普遍存在抗原变异的现象。

### 1.2.5 McAb 在 CSFV 蛋白质抗原表位研究方面的应用

抗原表位是免疫原引起免疫应答以及与抗体产生特异反应的基本结构单位。在蛋白质抗原中，抗原表位是由氨基酸残基组成的，一个表位可由3~8个氨基酸组成。抗原表位按结构不同分为连续性和不连续性两种抗原表位。前者又称线性表位，是由肽链上顺序连续的氨基酸组成；后者又称构象型表位，是由那些空间邻近的但顺序上不连续的氨基酸组成，如溶菌酶的抗原表位（善谦等，1999）。

猪瘟病毒E2囊膜糖蛋白是CSFV的主要中和性抗原蛋白，它在病毒多聚蛋白上的氨基酸残基位置为690aa-1063aa。利用CSFV作为抗原制备的单抗大多是直接针对E2蛋白的，而且这些单抗中绝大部分具有病毒中和能力（Greiser et al, 1990；van Rijn et al, 1993）。因此，许多学者选定该蛋白作为CSFV抗原表位分析的主要对象。Wensvoort最早对CSFV E2蛋白的抗原表位进行分析，他用制备的13株抗CSFV McAb在竞争结合法和抗原捕捉测定中确定E2抗原表位大致范围。证明E2蛋白上存在4个相互独立的抗原区：A、B、C、D。A区可分为A1、A2和A3亚区，针对A1和A2亚区的单抗与所有被测定的94株CSFV反应，因此认为A1和A2是保守抗原区，而A3、B和C区则呈现不同程度的变异性。中和试验证明抗A、B和C三区的8株单抗具病毒中和活性，表明A、B和C区是中和性抗原表位区。这一结论也被Van Rijn等（1992）的研究证实，他们通过E2基因突变得得到无B/C区和无A区的E2蛋白，动物实验证明二者均能保护猪抵抗致死量CSFV的攻击。Wensvoort等（1989）还发现A1与B、A1与C之间诱发的中和反应具有协同效应。由此推测，既保守又有中和活性的A1亚区在CSFV抗原性方面扮演一个非常重要的角色。在免疫过氧化物酶细胞单层试验（IPMA）和中和性试验中，应用8株针对不同表位区的中和性单抗筛选出7株逃脱中和的变异株，但这些变异株却都被中和性抗原表位区中另外某一区单抗所染色和中和，这进一步证明了各区之间的独立性。这四个抗原区域所在E2上的位置已被确定下来：B的所有表位和C的一个表位位于氨基酸残基690~773之间，C区域的其它表位所处区域较宽，在氨基酸残基690-800之间，A1

和A2亚区位于766~866残基之间，A3亚区位于766~813残基之间，D区只有一个抗原表位，位于766~800残基之间。

van Rijn等(1994)还研究了Cys对各抗原表位的影响。他们用8株A、B和C区的中和性单抗分离出逃脱中和的变异株(McAb-resistant mutants)，然后将这些变异株的E2基因克隆入真核表达载体并转染COS1细胞，再用19株McAb(包括用来分离变异株的单抗和D区单抗)进行IPMA试验，结果表明：除了E2第792位的Cys突变为Arg这一突变使A、D两区域抗原表位全部发生改变外，其余氨基酸残基的突变都只是局限于影响用来分离变异株的单抗的反应性。为了进一步研究蛋白质二级结构对抗体结合的影响，他们用点突变的方法，将E2蛋白N端所有Cys都替换为Ser，IPMA试验发现第693和737位的Cys对B和C区的抗原表位是必需的，而第792、818、828、和856位的Cys对A和D两区域的抗原表位是必需的，并推测这6个Cys对于各区间形成二硫键进而折叠成二级结构具有重要意义。

Yu等(1996)利用酵母表达的重组E2蛋白(aa 544~1093, 基因序列来源于CSFV Weibridge株)为免疫原，制备出一株抗CSFV单抗，经Western blotting和ELISA试验发现该单抗不与纯化的、具完整结构的病毒粒子反应，而只与变性的和经1%NP40处理过的、结构遭破坏的病毒蛋白反应，表明该单抗表位不在病毒粒子表面。他们进一步通过靶基因表位文库技术和噬菌体展示随机肽库技术分析该单抗表位位置，结果表明，在E2蛋白C端存在一线性表位，核心序列为YYEP(995aa-998aa)。作者认为该表位接近C端跨膜区，不能充分暴露于病毒粒子表面，故不与完整病毒粒子反应。这一表位在瘟病毒属的二个不同成员中是高度保守的，因此被认为是瘟病毒共有的抗原表位。

根据蛋白质的一级结构，利用计算机分析，按照每一个氨基酸的亲水性、柔韧性等来预测哪些片段可能构成抗原表位，然后合成每一段小肽，利用单克隆抗体来检测能起反应的片段，以获得抗原表位。这也是研究抗原表位的主要方法之一。马刚等(2003)通过该方法发现了CSFV E2的另外一个可能的表位，位于aa 773~784之间。

肖昌等(2005)利用噬菌体随机12肽库对抗CSFV糖蛋白E2特异的单抗A11进行表位鉴定，经过4轮筛选后，随机挑取10个噬菌体克隆作竞争ELISA检测，经测序表明8个噬菌体克隆的12肽序列均含有XXWRXXXL核心序列，该核心序列与猪瘟病毒E蛋白的28~35位氨基酸TTWKEYSH有一定的同源性，人工合成的含有部分核心序列氨基酸的多肽可以与单抗A11反应，表明单抗A11所针对的抗原表位位于CSFV E2蛋白的28~35位氨基酸。

张富强等(2005)采用抗CSFV(Alfort Tübingen株)E2结构蛋白的单克隆抗体c2410和a18，淘选噬菌体展示的12肽随机肽库，对CSFV E2蛋白表位进行分析。研究发现，单克隆抗体c2410和a18识别同一线性表位，定位于E2蛋白的832~837位氨基酸(SPTTLR)。

### 1.3 本研究的背景与目的

易感猪在接种CSFV弱毒苗或灭活苗后，可产生对CSFV的免疫应答并获得抵抗CSFV感



染的能力，接种后猪血清中的中和抗体水平与其获得的保护力呈正相关。这说明体液免疫在猪抗CSFV免疫反应中起着主要作用（Terpstra et al, 1998）。

1990年，Welland等（1990）用6种CSFV单抗测定CSFV的融合蛋白，结果6种单抗均只与源于E2的融合蛋白反应，其中5种单抗具有中和CSFV的活性。这表明E2是一种保护性抗原蛋白。1991年van Zijl等（1991）以伪狂犬病病毒弱毒疫苗为载体，E2基因插入到其TK基因中，获得了3种重组病毒，免疫猪后均可产生对CSFV的免疫应答。攻毒试验结果表明，E2足以产生抗CSFV的保护性免疫应答。Rumenapf等（1991）以痘苗病毒为载体，构建了3种不同的含CSFV基因的重组病毒，免疫攻毒试验结果进一步证实了E2是CSFV保护性抗原。

单克隆抗体以其高度特异性和敏感性，在猪瘟病毒的鉴别诊断、抗原与蛋白结构间关系、保护性抗原的鉴定、抗原变异和抗原表位研究方面显示出独到的作用。

基于以上理论基础和我国的猪瘟流行情况，本研究选定CSFV的主要抗原基因E2为研究对象，试图在尽量保存CSFV E2基因原始抗原性的前提下，选取E2基因上的主要抗原区在大肠杆菌中进行表达，并进一步以纯化的目的蛋白为免疫原制备单克隆抗体；为猪瘟的病原学研究及其临床诊断方法的建立提供条件和基础。

## 第二章 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区的克隆及表达

猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 为黄病毒科瘟病毒属成员。由CSFV引起的猪瘟 (CSF) 遍布于世界, 具有高度接触性和巨大的经济损失的传染病。该病主要在南美和亚洲地区流行, 在欧洲一些国家也时有发生。我国是CSF流行较严重的国家, 每年因CSF死亡的猪占饲养总数的3~5%, 而每年的经济损失约20亿元左右。

CSFV为单股正链RNA, 约12.3kb, 仅含一个大开放阅读框, 由12个编码结构蛋白与非结构蛋白的基因组成。E2区编码的是CSFV的gp55蛋白, 该蛋白参与病毒感染细胞的过程并引起猪的保护性免疫, CSFV的中和性抗原表位都在E2 (gp55) 蛋白上, 因而E2在CSFV的研究中倍受重视。该基因中包含A、B、C三个中和抗原表位的核酸区段, 是通用的绘制CSFV遗传发生树的序列区段。

本实验利用PCR技术扩增出猪瘟病毒 (CSFV) C株的E2基因主要抗原区, 即tE2片段, 将其定向克隆到表达载体pPROEX-HTb中, 获得重组质粒pPROEX-tE2; 将pPROEX-tE2转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 后, 用IPTG诱导, 获得CSFV tE2蛋白的高效表达, 经检测tE2具有生物学活性; 这为今后开发基因工程亚单位疫苗、制备临床诊断抗原、制备针对猪瘟病毒E2基因的单克隆抗体等研究提供了很好的基础。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 毒株、菌株与质粒

猪瘟病毒兔化弱毒疫苗 (C株) 和石门株、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株、表达载体pPROEX-HTb由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室保存。

#### 2.1.2 工具酶及试剂

*Xho*I、*Bam*HI等限制性内切酶及LA Taq DNA聚合酶、IPTG、DL 15 000 DNA Marker、DL 2 000 DNA Marker、TaKaRa ExTaq和Reverse Transcriptase XL (AMV) 抗生素购自宝生物 (大连) 有限公司; T4 DNA连接酶, dNTP、蛋白质Marker等购自Fermentas公司; TRIzol RNA提取试剂盒购自Gibco公司; Gel Extraction Kit (100) 购自上海华舜生物工程有限公司; RoboPop<sup>TM</sup> Ni-NTA His-Bind Purification Kit购自Novagen公司; 96孔酶标反应板购自江苏省三和华兴实验玻仪厂; 辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG (IgG-HRP), 购自Sigma公司; 猪瘟阳性、阴性参考血清购自中国兽医药品监察所。

### 2.1.3 主要实验仪器

Beckman高速离心机J21-M、GS-15R台式离心机、Biometra Tg PCR仪、(MJ Research) Ultraspec R3000紫外分光光度 (Pharmacia Biotech INC) HZQ-C空气浴摇床 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司) 无菌操作台、320 pH计 (Beckman) WMZK-01恒温培养箱 (上海医用仪表厂) DK-8D恒温水浴箱 (上海精密实验设备有限公司) 低温冰箱 (Revco公司) Model 680型酶联免疫检测仪 (BIO-RAD公司)。

### 2.1.4 引物的设计与合成

利用DNASTAR软件对CSFV C株E2基因进行分析,选取了CSFV E2基因的主要抗原区,既覆盖了E2基因的A、B、C、D四个抗原区的重叠部分,又避开了大肠杆菌中的稀有密码子。根据GenBank中公布的序列设计特异性引物,由上海博亚生物工程公司合成后,上游引物P1: 5'-AGT GGA TCC TAT TTG GCA TCA TTG-3',下游引物P2: 5'-GAC CTC GAG TTC ACC TTT CAC ACA T-3',5'端加上BamHI酶切位点,3'端加上XhoI酶切位点,预期扩增片段长度为378bp。

### 2.1.5 病毒 RNA 提取

用TRIzol试剂消化猪瘟病毒疫苗毒细胞,按照试剂盒说明书介绍的方法提取病毒RNA。具体操作步骤如下:

- 1) 于 1.5ml的离心管中,加入 1ml TRIzol试剂。
- 2) 30<sup>°</sup> 作用 15min,加入 0.2ml 的氯仿,震荡 15s,室温下作用 5min,4<sup>°</sup> 12,000×g 离心 10min。
- 3) 将上清转入一个新的离心管中,加入 0.5ml 的异丙醇,室温下作用 10min,4<sup>°</sup> 12,000×g 离心 10min,弃掉上清。
- 4) 加入 75%乙醇 1ml,4<sup>°</sup> 7,500×g 离心 1min。
- 5) 真空抽干,用适量的含有 DEPC 的 TE 溶解,分装保存。

### 2.1.6 CSFV tE2 基因片段的 RT-PCR 扩增和克隆

用所提取的病毒RNA进行RT-PCR,反应总体积为30 $\mu$ l,在0.5ml PCR反应管中依次加入去离子水10 $\mu$ l、RNA 6 $\mu$ l、dNTP4 $\mu$ l、反转录酶1.5 $\mu$ l、RNase抑制剂0.5 $\mu$ l、随机引物2 $\mu$ l、病毒RNA 6 $\mu$ l。室温放置10min后,42<sup>°</sup> 水浴1h。反应完毕后,取适量模板,再分别加入tE2片段的上、下游引物各2 $\mu$ l,dNTP 5 $\mu$ l,10×LA Taq酶缓冲液5 $\mu$ l,LA Taq酶0.5 $\mu$ l,模板4 $\mu$ l,

PCR扩增目的基因。扩增条件为95℃ 变性5min；94℃ 变性1min、58℃ 退火1min、72℃ 延伸1min，共35个循环；最后72℃ 延伸10min。同时以去离子水作空白对照。取5μl PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

扩增产物用上海华舜公司的胶回收试剂盒回收。依据T-A原理，按照载体说明书与pMD18-T载体连接，通过X-gal和IPTG、氨苄青霉素抗性以及限制性内切酶筛选重组克隆。用BamHI和XhoI分别双酶切重组质粒进行鉴定，并对经鉴定为阳性克隆株进行测序。

### 2.1.7 表达载体的构建与鉴定

将鉴定为阳性克隆的重组于T载体的目的片段用BamHI和XhoI双切后胶回收目的片段，并与用同法酶切回收后的pPROEX-HTb载体16℃ 连接过夜，然后转化感受态细胞DH5α，得到重组表达载体pPROEX-tE2。

通过氨苄青霉素（Amp）抗性进行筛选，用限制性内切酶BamHI和XhoI进行酶切鉴定，同时对酶切鉴定为阳性的质粒再进行PCR鉴定。在50μl反应体系中加入5μl 10×LA Taq Buffer、2U LA Taq DNA聚合（酶TaKaRa）、0.4μM引物、200μM dNTPs、1μl模板。同时设立无模板对照。PCR反应条件为：95℃ 4 min；94℃ 1min，58℃ 30s，72℃ 1min，35个循环；72℃ 10min。反应结束后，取5μl扩增产物用1.0%琼脂糖电泳检查扩增结果。

对酶切及PCR鉴定为阳性克隆的质粒进行序列测定分析，利用NCBI Blast进行序列比较，并用Gene Runner分析，进一步确定重组质粒的正确性。

### 2.1.8 蛋白的诱导表达及纯化

将鉴定为阳性的克隆菌株扩大培养，用IPTG进行诱导表达。将菌液分为5份，分别加入IPTG至终浓度为0.2、0.4、0.6、0.8和1.0mM。并且同时在培养后1h开始，每隔1h取少量菌液测定表达蛋白含量，共取5次，确定最佳IPTG诱导浓度及诱导时间。确定最佳的诱导表达条件后，将重组质粒大量培养，菌体蛋白按照RoboPop™ Ni-NTA His-Bind Purification Kit试剂盒说明书进行处理和纯化。具体操作步骤如下：

1) 样品制备：收获细菌培养物50ml，4℃ 8,000×g离心10min，将沉淀溶于5ml 4℃ 预冷的PBS（137mM NaCl、2.7mM KCl、4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH7.3）中，高密度超声波裂解2min，10,000×g离心10min，用3ml Buffer B（8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Tris-HCl，pH8.0）重悬沉淀，室温轻轻混匀15~60min。10,000×g离心25min，去除细胞碎片。将上清移入新管中，加入50% Ni-NTA His-Bind Resin 1ml，室温振荡结合15~60min。

2) 过柱：将纯化柱垂直固定于合适的支架上，吸取结合的Ni-NTA His-Bind Resin加入纯化柱中，借重力沉降使液体排干；加入4ml Buffer C（8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Tris-HCl，pH6.3）静置，使液体排干，重复2次；加入0.5ml Buffer D（8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Tris-HCl，pH5.9）洗脱，让液体靠重力沉降，待液体排干后，重复4次；再加入0.5ml Buffer E（8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Tris-HCl，pH4.5）洗脱，重复4次。

### 2.1.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

将含有重组质粒的大肠杆菌在新鲜培养基 (LB) 中37℃振荡培养, 根据所确定的最佳IPTG诱导浓度及诱导时间进行诱导后离心收集菌体, PBS洗涤, 按1/10体积比浓缩, 与等体积的凝胶上样缓冲液 (100mM Tris-HCl、200mM DTT、4%SDS、0.2%溴酚蓝、20%甘油, pH6.8) 混合, 煮沸5min变性。利用BioRad公司的蛋白质电泳装置作SDS-PAGE。上层胶丙烯酰胺浓度为5%, 分离胶的浓度为12%, 基层胶电压为60V, 下层胶120V, 0.25%考马斯亮蓝 (R-250) 染色; 同时以空载体在同等条件下诱导表达作阴性对照。最后, 用CS-900型薄层凝胶扫描分析仪对表达产物进行分析, 测定表达产物的相对含量。

### 2.1.10 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

用0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将纯化的tE2蛋白稀释成10μg/ml或超声裂解物上清液进行50倍稀释, 以100μl/孔包被ELISA板, 4℃过夜, 用5%脱脂乳于37℃封闭3h。封闭后用PBST (含0.05% Tween-20的PBS) 洗4遍, 然后加入一抗 (猪瘟兔化弱毒阳性血清或CSFV石门株强毒阳性血清), 37℃作用1h, PBST洗4遍; 加入二抗 (辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG), 用前按1:5000稀释; 37℃作用1h, PBST洗4遍, 加入OPD显色液显色15min, 每孔加50μl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应, 于490 nm波长测量吸光值; 同时设猪瘟阴性血清对照。ELISA具体操作步骤参照朱立平等 (2000) 介绍的方法进行。

### 2.1.11 Western blotting 分析

首先将样品按照2.1.9所提到的进行处理, 然后进行SDS-PAGE电泳, 待到样品即将跑出胶时停止关掉电源, 尔后取出凝胶板, 将聚丙烯酰胺凝胶用去离子水冲洗后进行电转, 条件为: 23mA稳流, 转印2~3h。电转移结束后, 切取含有蛋白分子量标准的硝酸纤维素膜用, 用考马斯亮蓝 (R-250) 染色, 再用脱色液进行脱色。将余下的硝酸纤维素膜 (标明正反面) 用PBS充分漂洗3次后, 用5%脱脂乳 (用PBS稀释) 于4℃封闭过夜。翌日, 加入用5%脱脂乳稀释的一抗 (猪瘟兔化弱毒阳性血清或CSFV石门株强毒阳性血清), 37℃作用1h, 用TBST (含0.05% Tween-20的0.01M Tris-HCl, pH7.6) 洗4遍, 每次5min; 加入用5%脱脂乳稀释的二抗 (辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG), 用前按1:5000稀释; 37℃作用1h, TBST洗4遍, 每次5min, 用TBS冲洗一次后显色, 显色10~15 min; 显色液按照分子克隆介绍的配方进行配制: 0.01M Tris-HCl, pH7.6、6mg/10ml DAB、0.03% NiCl<sub>2</sub>、10μl/10ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

## 2.2 结果

### 2.2.1 tE2 基因片段正确插入表达载体中

提取CSFV RNA进行反转录后,以病毒cDNA为模板扩增tE2片段,取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明扩增片段大小为378bp。与预期分子量大小一致。电泳结果如图2-1。



图 2-1 CSFV tE2 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 2-1 Amplification of truncated E2 gene by RT-PCR

1. DL 2000 DNA marker
2. CSFV RNA
3. 水对照

将CSFV tE2片段克隆于pPROEX-HTb表达载体后转化大肠杆菌,提质粒鉴定阳性克隆,空载体分子量为4750bp,加入外源片段后进行琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明获得了预期大小一致的阳性克隆(约5.2kb)。

用限制性内切酶*Bam*HI和*Xho*I对重组表达质粒pPROEX-tE2进行酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳分析表明,目的片段插入到表达载体中,结果如图2-2。对酶切鉴定为阳性的质粒再进行PCR鉴定,进一步证实了重组质粒的正确性。对鉴定为阳性的克隆株进行测序分析,结果表明插入的外源片段序列和阅读框架正确无误。

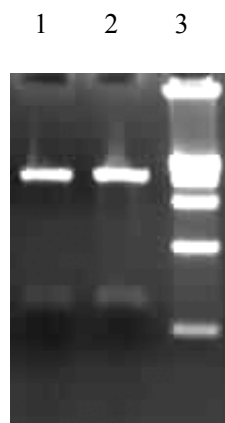


图 2-2 pPROEX-tE2 的酶切鉴定

Fig. 2-2 Identification of pPROEX-tE2 by digestion with *Bam*HI and *Xho*I

- 1、2. pPROEX-tE2 用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切
3. DL 15000 marker

2.2.2 重组蛋白获得高效表达

取不同诱导时间下各IPTG浓度梯度菌液测定蛋白含量后，结果表明，IPTG浓度为0.8mM、诱导时间为4h，蛋白表达含量达到最高，占总菌体的35%，将此条件确定为最佳诱导条件。

在最佳诱导条件下诱导表达截短的重组E2蛋白（tE2），收获表达蛋白，按照常规方法处理后取少量样品进行SDS-PAGE电泳分析，结果表明所表达的重组蛋白以包涵体的形式存在，分子量约为19kDa，与预期大小一致（图2-3）；然后按照优化的条件进行大量诱导表达和纯化，得到纯度达95%以上的tE2蛋白（图2-4）。

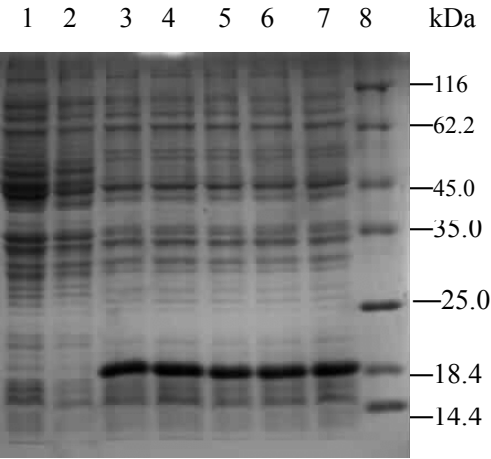


图 2-3 诱导表达的 tE2 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-3 SDS-PAGE analysis of the recombinant tE2 protein

- 1. 大肠杆菌DH5α对照；
- 2. pPROEX-HTb 转化菌对照；
- 3、4、5、6、7 分别为不同浓度 IPTG 诱导的 pPROEX-tE2 转化菌；
- 8. 蛋白质分子量标准

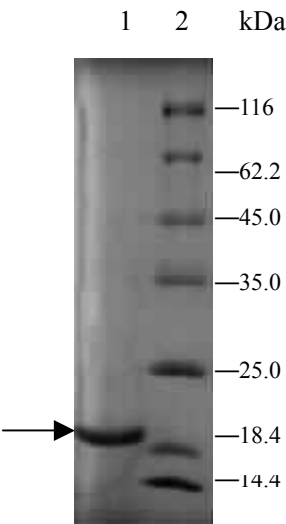


图 2-4 tE2 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein tE2 purified on Ni-NTA affinity column

- 1. 纯化后的重组蛋白 tE2；
- 2. 蛋白质分子量标准

2.2.3 重组蛋白能被猪瘟病毒特异性血清所识别

用纯化后的重组蛋白tE2包被聚苯乙烯板，进行间接ELISA检测，一抗为猪瘟兔化弱毒或石门强毒阳性血清，二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG，结果发现重组蛋白能与猪瘟兔化弱毒和石门强毒阳性血清特异性结合，但猪瘟兔化弱毒抗血清的反应性高于石门强毒抗血清（图2-5）。

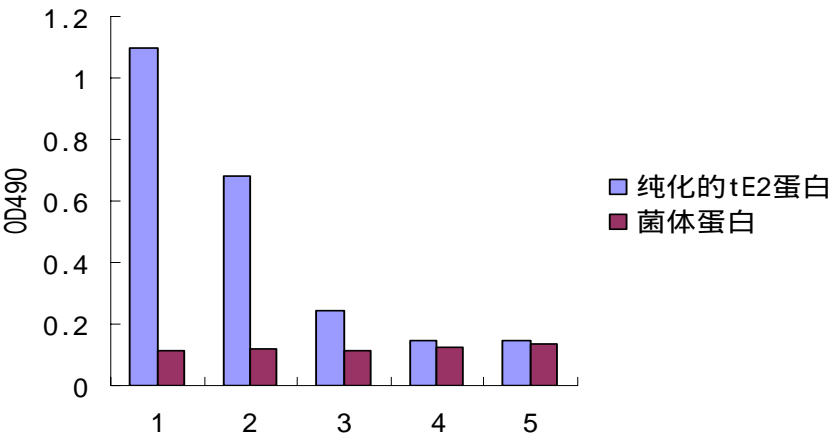


图 2-5 重组蛋白 tE2 的间接 ELISA 检测

Fig. 2-5 Detection of the recombinant protein tE2 by indirect ELISA

1. 猪瘟兔化弱毒阳性血清 100 × 稀释； 2. 猪瘟兔化弱毒阳性血清 200 × 稀释；  
3. 猪瘟病毒石门株阳性血清 100 × 稀释； 4. 猪瘟病毒石门株阳性血清 200 × 稀释；  
5. 猪瘟病毒阴性血清

利用猪瘟兔化弱毒阳性血清为一抗，对表达的重组蛋白tE2进行检测，结果表明，所表达的重组蛋白可与猪瘟病毒抗血清发生反应（图2-6）。

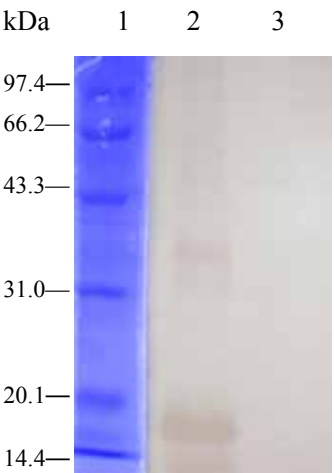


图 2-6 重组蛋白 tE2 的 Western blotting 分析

Fig. 2-6 Identification of the recombinant protein

tE2 by Western blotting

1. 蛋白质分子量标准；  
2. tE2 蛋白；  
3. 空载体转化菌对照



## 2.3 讨论

猪瘟是对养猪业危害极大的一种烈性传染病，具有高度传染性，在猪瘟呈地方性流行的国家和地区，特别是在集约化养猪地区，精心设计的系统性免疫接种对于预防猪瘟是有必要的，并且可以作为根除CSFV的基础。在无猪瘟的国家和地区一旦发生疫情，采用疫苗紧急接种来控制疫情，也可以最大限度地减少经济损失。

CSFV囊膜糖蛋白E2是CSFV的主要保护性抗原蛋白，也是CSFV特异性表位分布区域，为CSFV抗原性、抗原变异、诊断及基因工程疫苗研究的主要对象。经分析不同单克隆抗体的生物学特性及识别病毒逃逸株或突变株的核酸序列差异，认为E2存在4个不同的抗原区A、B、C、D，其中A区进一步划分为A1~A3亚区，在所有抗原区或亚区中，A1亚区诱导产生的单克隆抗体不仅对病毒感染具有中和作用，而且能识别所有CSFV分离毒株，并与相关瘟病毒BVDV、BDV有交叉反应。

本研究运用DNASTAR等生物学软件对CSFV E2基因的抗原编码区进行了分析并设计上下游引物，然后利用PCR技术对CSFV E2基因的主要抗原区进行了扩增；扩增的片段长378bp，既覆盖了A、B、C、D四个抗原亚区的重叠部分，又避开了大肠杆菌中的稀有密码子，在设计上既保证了CSFV tE2蛋白的抗原性又提高了CSFV tE2蛋白获得高效表达的可能性。这一点通过对tE2蛋白的抗原性检测及其诱导后在大肠杆菌中的高效表达得到证实。

本试验应用原核表达系统，以融合蛋白的形式高效表达了CSFV tE2蛋白（约占菌体总蛋白的35%），由于表达量高所以目的蛋白以包涵体的形式存在于胞内，这在蛋白的高效表达中是经常存在的；经过扩大培养后利用镍柱纯化tE2蛋白，然后进行目的蛋白的生物活性检测（包括间接ELISA检测和Western blotting分析），结果表明：该蛋白能与CSFV的多克隆阳性血清发生反应，具有CSFV E2蛋白的生物学活性而且反应敏感、非特异性背景较低，这为今后开发基因工程亚单位疫苗、制备临床诊断抗原、制备针对猪瘟病毒E2基因的单克隆抗体等研究提供了很好的基础。

## 第三章 针对猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体的制备

单克隆抗体 (McAb) 以其高度的特异性和敏感性而在 CSFV 的生物学特性研究与诊断中起着重要的作用。由于高质量的 CSFV 抗原不易获得, 目前建立的抗 CSFV 单抗细胞株较少 (周宗安等, 1989)。为了建立生产上对该病的临床检测、监测方法, 研究 CSFV 生物学特性及其抗原基因变异与病毒抗原变异的关系, 必须制备针对 E2 抗原决定簇或抗原表位的特异单克隆抗体。本研究就是在表达具有生物学活性的猪瘟病毒 E2 蛋白的基础之上, 利用 PEG 融合的方法制备了一株针对 E2 基因的特异性单克隆抗体, 为猪瘟病毒的生物学研究和临床诊断方法的建立提供了条件。

本实验利用原核表达系统对 CSFV tE2 蛋白进行大量诱导表达并纯化, 然后用纯化的 CSFV tE2 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 同时采血进行间接 ELISA 检测, 取检测阳性鼠的脾淋巴细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 经筛选、单克隆化后获得一株能够稳定分泌抗 CSFV tE2 蛋白的杂交瘤细胞株; 经特异性鉴定发现该株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体是针对猪瘟病毒 E2 基因的并且能够与 CSFV C 株和石门株发生特异性反应, 为研究猪瘟病毒 E2 基因的生物学特性及猪瘟病毒临床诊断方法的建立准备了条件。

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 细胞、实验动物及试剂

骨髓瘤细胞 SP2/0 由本实验室保存; 实验用 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供; 弗氏佐剂、选择试剂 HAT、HT、融合剂 PEG3250 购于 Sigma 公司; 标准胎牛血清、培养基 RPMI-1640 购于 Gibco 公司; 聚苯乙烯微量反应板购自江苏省三和华兴实验玻璃仪器厂; 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购于 Persen 公司; 表达 CSFV E2 蛋白的杆状病毒由本实验室构建。

#### 3.1.2 试剂配制

(1) RPMI-1640 培养液: 补充 10% 胎牛血清、L-谷氨酰胺 2mM、青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml。

(2) HAT 培养液: 在上述含 10% 胎牛血清的 RM-1640 培养液中, 添加 13.61μg/ml 次黄嘌呤、0.176μg/ml 氨基喋呤和 3.88μg/ml 胸腺嘧啶。制备 100×HAT 储存液, 其中含 1.361mg/ml 次黄嘌呤、0.0176mg/ml 氨基喋呤和 0.388mg/ml 胸腺嘧啶, 分装, 冷冻保存暗处 (氨基喋呤

对光敏感), 用时取储存液稀释。

(3) HT培养液: 配置方法与HAT培养液相似, 但不加氨基喋呤用次黄嘌呤和胸腺嘌呤配制成100×HT培养液, 储存于4℃。使用时取储存液稀释。

(4) PEG: 不要求精确的分子量, 本实验使用PEG3250。配制时称取所需PEG, 高压灭菌30min, 冷却至约80℃ (PEG仍为液体状态), 加入适量无胎牛血清的RPMI-1640培养液。PEG的所需浓度与其毒性浓度十分接近, 一般以30~50%为适宜浓度。

### 3.1.3 抗原的制备

将重组蛋白大量诱导表达后收集菌体并进行超声波裂解, 离心后收集沉淀, 按照RoboPop™ Ni-NTA His-Bind Purification Kit试剂盒蛋白纯化说明书进行纯化。试剂及步骤概括如下: 收集沉淀用STE (10mM Tris, pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) 按20ml/100ml菌液的比例洗涤沉淀一次。5000×g离心后用含溶菌酶 (100μg/ml) 的STE (10ml/100ml菌液) 重悬沉淀, 冰浴15min; 加入DTT (至终浓度1.5%), 涡旋30s。再在冰浴条件下超声波裂解。裂解物12000×g离心, 上清移至新管, 加入Triton-X100至终浓度2~4%。将制备物加入纯化柱按照说明书介绍的方法挂柱纯化。洗脱液用pH不同的8M尿素, 并对纯化后的蛋白进行浓度测定。

### 3.1.4 动物免疫

取纯化的tE2蛋白抗原按50μg/只的剂量, 加等体积弗氏完全佐剂乳化, 经皮下多点注射或腹腔注射免疫BALB/c小鼠, 以后每间隔两周再用弗氏不完全佐剂乳化的融合蛋白加强免疫两次, 在取脾细胞融合前3天, 分别用25μg融合蛋白用弗氏不完全佐剂乳化, 经尾静脉加强免疫一次。

### 3.1.5 细胞融合

1) 饲养细胞制备: 融合前一天, 取8~12周龄健康BALB/c小鼠一只, 颈椎脱臼致死, 75%酒精中浸泡消毒5min, 固定于超净台内蜡盘上, 用无菌小镊子提起小鼠腹部皮肤, 剪开腹部皮肤 (注意不可损伤腹膜), 经钝性剥离, 使腹膜充分暴露。酒精擦拭消毒后, 用一次性无菌注射器吸取8~10ml不完全培养液注入小鼠腹腔, 右手固定注射器保持不动, 左手用镊子夹取酒精棉球轻轻揉动小鼠腹部1~2min, 再用注射器吸出腹腔内的培养液 (内含巨噬细胞), 注入灭菌离心管中, 离心。用完全培养液重悬, 细胞计数, 计算密度。调整完全培养液体积, 使细胞浓度在 $10^5$ 个/ml左右, 用多道移液器按100μl/孔加入到96孔细胞培养板中, 37℃, 饱和湿度, 5% CO<sub>2</sub>培养。18~24h后观察细胞生长状态, 细胞呈多形性, 贴壁紧密, 折光性好时可用。

2) 脾细胞的制备：取加强免疫的BALB/c小鼠，眼球摘除放血，分离血清供做阳性对照；将小鼠颈椎脱臼处死，75%酒精浸泡消毒5min，移入超净工作台内，固定于蜡盘上，无菌剪开皮肤和腹膜，取出脾脏，放入预加有不完全培养液的无菌平皿中清洗，剥离被膜上的脂肪和结缔组织。将脾脏移入另一盛有不完全1640培养液的平皿内，剪碎，200目铜网过滤，收集脾细胞，1000r/min离心10min，弃上清，用20ml不完全培养液洗涤一次后将细胞重新悬浮，台盼兰染色，细胞计数，备用。

3) 细胞融合：取骨髓瘤细胞SP2/0与免疫鼠脾细胞按细胞数量1:2~1:5混合，800r/min离心10min，弃上清，倒扣于无菌吸水纸上充分吸干残余液体，用手指弹击管底，使细胞松散；将含有两种细胞的融合管置于37℃水浴，在1~2min内缓慢加入融合剂，边滴边转动离心管；然后，以逐步稀释的方式加入预热的基础培养基，逐步将PEG稀释；在最后补加不完全培养液至50ml轻轻搅动离心管使融合剂彻底稀释。800r/min离心5min，弃上清，将细胞沉淀轻悬于含20%胎牛血清的HAT选择培养液中，混合均匀，用多道移液器加入到已铺有饲养细胞的96孔细胞培养板中，每孔100μl，将培养板移至37℃，饱和湿度，5% CO<sub>2</sub>培养。

具体融合过程按文献报道的方法（Kohler and Milstein et al）进行。融合后加入选择培养基HAT于37℃ CO<sub>2</sub>培养箱进行选择培养。约7~10天，当有融合细胞出现时，更换HT培养基继续培养。

### 3.1.6 阳性杂交瘤细胞的筛选

依据可溶性抗原的抗体筛选法，用酶联免疫吸附实验（ELISA）检测以筛选阳性细胞克隆株。用融合表达的蛋白作为检测抗原，以5μg/ml浓度包被96孔板，每孔100μl，置4℃过夜后，洗液洗三次，3min/次。封闭：含0.5%的脱脂乳PBS，150μl/孔，37℃作用2h。加入杂交瘤细胞上清作用60min。用PBST将二抗（兔抗鼠IgG）按1:5000稀释，作用60min。底物显色，每孔100μl显色液，闭光作用30min。终止：加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，每孔50μl。酶标仪读数：单波长，490nm下测定OD值。

### 3.1.7 阳性杂交瘤细胞的克隆

用纯化的重组蛋白（tE2）作为检测抗原，以5μg/ml浓度包被96孔板，将经初步筛选得到的可疑阳性细胞克隆株用有限稀释法再进行3~5次单克隆，同时用间接ELISA方法进行检测。筛选阳性株一般选用的骨髓瘤细胞为HAT敏感细胞株，所以只有融合细胞才能持续存活一周以上。融合细胞呈克隆生长，经有限稀释后（一般稀释至0.8个细胞/孔），按Poisson法计算，应有36%的孔为1个细胞/孔。细胞培养至覆盖10~20%孔底时，吸取培养上清用ELISA检测抗体含量。首先依抗体的分泌情况筛选出高抗体分泌孔，将孔中细胞再行克隆化，尔后进行抗原特异的ELISA测定，选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

### 3.1.8 单克隆抗体的大量制备

将0.5ml/只剂量的液体石蜡注射到10周龄左右的BALB/c小鼠腹腔,一周后将 $10^5$ 个/只杂交瘤细胞注入提前用液体石蜡处理的小鼠腹腔,7~10天后当小鼠腹部极度膨胀时抽取腹水,隔两天抽一次,将抽取的腹水10,000r/min离心10min,去除上层油脂和沉淀,上清分装于-20保存。

### 3.1.9 ELISA

单克隆抗体与猪瘟病毒兔化弱毒苗(C株)的反应:将5ml猪瘟病毒疫苗毒(细胞毒)反复冻融3次以上离心,取上清超声波碎后与等体积pH9.6的包被缓冲液混合,包被于96孔酶联反应板4过夜(不少于12h),然后用5%脱脂乳于37 封闭2h,用PBST洗涤4次后备用。一抗分别为细胞培养上清和腹水,并且分别从1倍和100倍开始做梯度稀释,37 作用1h,PBST洗涤4次;二抗为HRP标记的羊抗鼠IgG,用前1:5000倍稀释,37 作用1h,用PBST洗涤4次;加入OPD显色液显色15~20min,加入50 $\mu$ l/孔2M  $H_2SO_4$ 终止,于490nm波长测量吸收值。同时以未接毒的PK15细胞作为阴性对照。

单克隆抗体与带有组氨酸标签的重组猪IFN- $\gamma$ 的间接ELISA反应:分别用纯化的tE2蛋白和猪IFN- $\gamma$ (0.3 $\mu$ g/孔)包被酶联反应板,一抗用杂交瘤细胞培养上清,二抗用HRP标记的羊抗鼠IgG,用前1:5000倍稀释;同时以破碎后的大肠杆菌DH5 $\alpha$ 包被酶联反应板作为阴性对照。

单克隆抗体与杆状病毒表达的E2蛋白的间接ELISA反应:分别用纯化的E2蛋白(分泌表达)和100 $\times$ 稀释的sf9细胞培养上清包被酶联反应板,一抗用杂交瘤细胞培养上清,二抗用HRP标记的羊抗鼠IgG,用前1:5000倍稀释,具体操作同上。

### 3.1.10 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)

将CSFV石门株细胞毒接种于刚刚长成单层的PK15上,并且设不接毒细胞对照,感作1~2h后,补加含2%胎牛血清(BVDV阴性)的细胞维持液,于72h后收毒,弃掉上清,用80%冷丙酮固定细胞培养板备用。一抗为杂交瘤细胞培养上清,二抗为HRP标记的羊抗鼠IgG,反应时间各为1~2h,中间用PBS各洗4次,显色底物为AEC,显色时间为15~30min(Wensvoort et al, 1988; Mere et al, 1981)。

### 3.1.11 Western blotting 分析

用表达猪瘟病毒E2蛋白的重组杆状病毒( 本研究室制备 )接种sf9昆虫细胞 ,72h后收毒 ,1000r/min离心 ,沉淀用PBS稀释后 ,与等体积的2 × SDS-PAGE上样缓冲液混匀 ,煮沸5~10min后 ,进行变性SDS-PAGE分析 ,然后转膜 ,条件为 :稳流 ,23~25mA。一抗用杂交瘤细胞培养上清 ,二抗用HRP标记的羊抗鼠IgG ( 具体操作见《分子克隆第三版》)。

### 3.1.12 单克隆抗体的亚型鉴定

按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明对多得到的单克隆抗体进行亚型鉴定。

## 3.2 结果

### 3.2.1 筛选出一株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞

用纯化的CSFV tE2蛋白免疫BALB/c小鼠 ,取抗体阳性小鼠的脾淋巴细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合、ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞、3~5轮单克隆化后 ,获得1株能够分泌特异性针对CSFV tE2蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。

### 3.2.2 单克隆抗体能与免疫原发生特异性反应

间接ELISA反应结果显示 ,单克隆抗体只与免疫原 (tE2蛋白) 发生特异性反应 ,而与猪IFN- $\gamma$ 不反应 ,说明单克隆抗体针对的是tE2蛋白 ,而非重组蛋白上的组氨酸标签 (图3-1)。

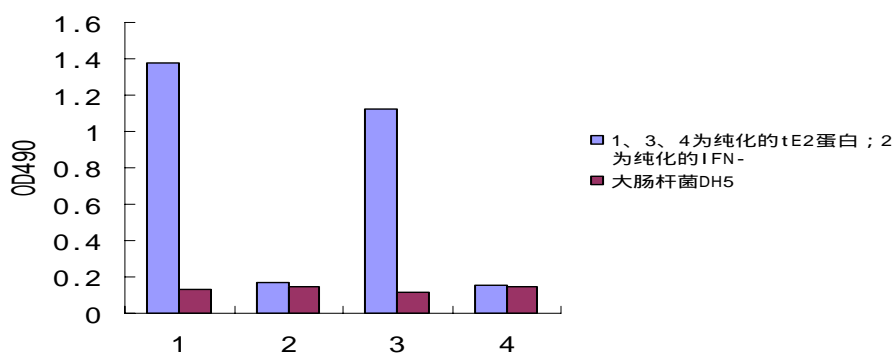


图 3-1 McAb 与免疫原 tE2 及带有组氨酸标签的重组 IFN- $\gamma$  的 ELISA 反应结果

Fig. 3-1 Reactivity of the anti-E2 McAb with recombinant tE2 or His-tagged interferon-gamma in indirect ELISA

1、2 为杂交瘤细胞培养上清 ; 3、4 分别为 CSFV 阳性和阴性血清

3.2.3 单克隆抗体能与猪瘟病毒发生特异性反应

分别用杂交瘤细胞培养上清和小鼠腹水与猪瘟病毒进行间接ELISA反应,说明单克隆抗体能够特异性地结合猪瘟病毒,未接毒的对照PK15细胞无明显反应,结果见图3-2和3-3。

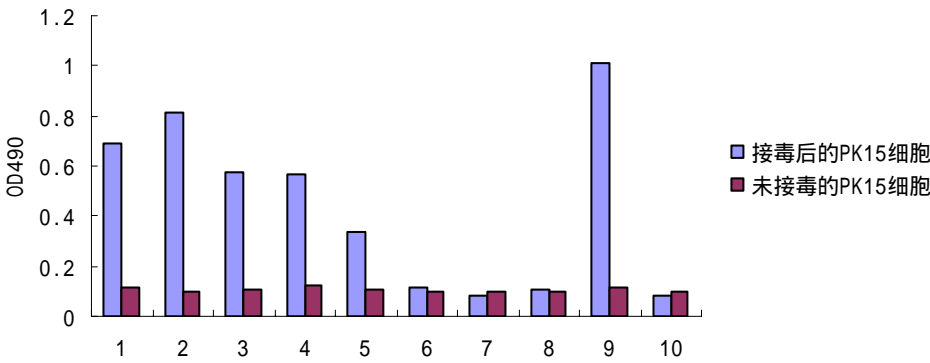


图 3-2 杂交瘤细胞培养上清与 CSFV 的 ELISA 反应结果

Fig. 3-2 Reactivity of the hybridoma supernatant with CSFV C-strain in indirect ELISA  
1、2、3、4、5、6、7 和 8 分别为杂交瘤细胞培养上清 1×、2×、3×、4×、5×、6×、7× 和 8× 稀释；9、10 分别为 CSFV 阳性血清和阴性血清对照。

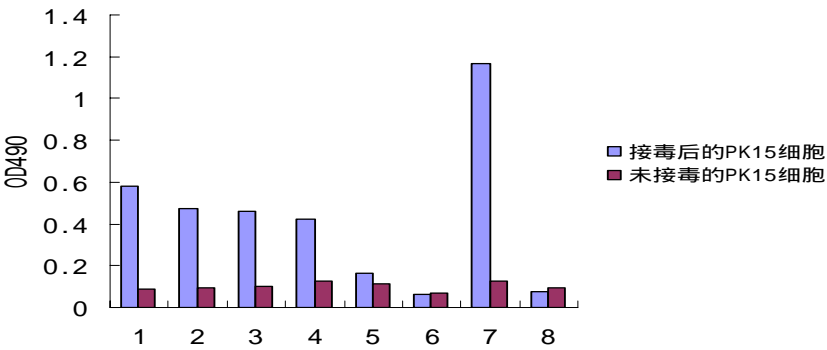


图 3-3 小鼠腹水与 CSFV 的 ELISA 反应结果

Fig. 3-3 Reactivity of hydrogaster of immunized mice with CSFV Shimen strain in indirect ELISA  
1、2、3、4、5、6 分别为小鼠腹水 1000×、2000×、3000×、4000×、5000×、6000× 稀释；7、8 分别为 CSFV 阳性血清和阴性血清对照。

通过IPMA试验证明,单克隆抗体能够与CSFV石门株特异性反应,CSFV感染细胞的胞浆被染成棕红色,对照细胞则无特异性染色,见图3-4,由此证明单克隆抗体可以用于CSFV的检测。

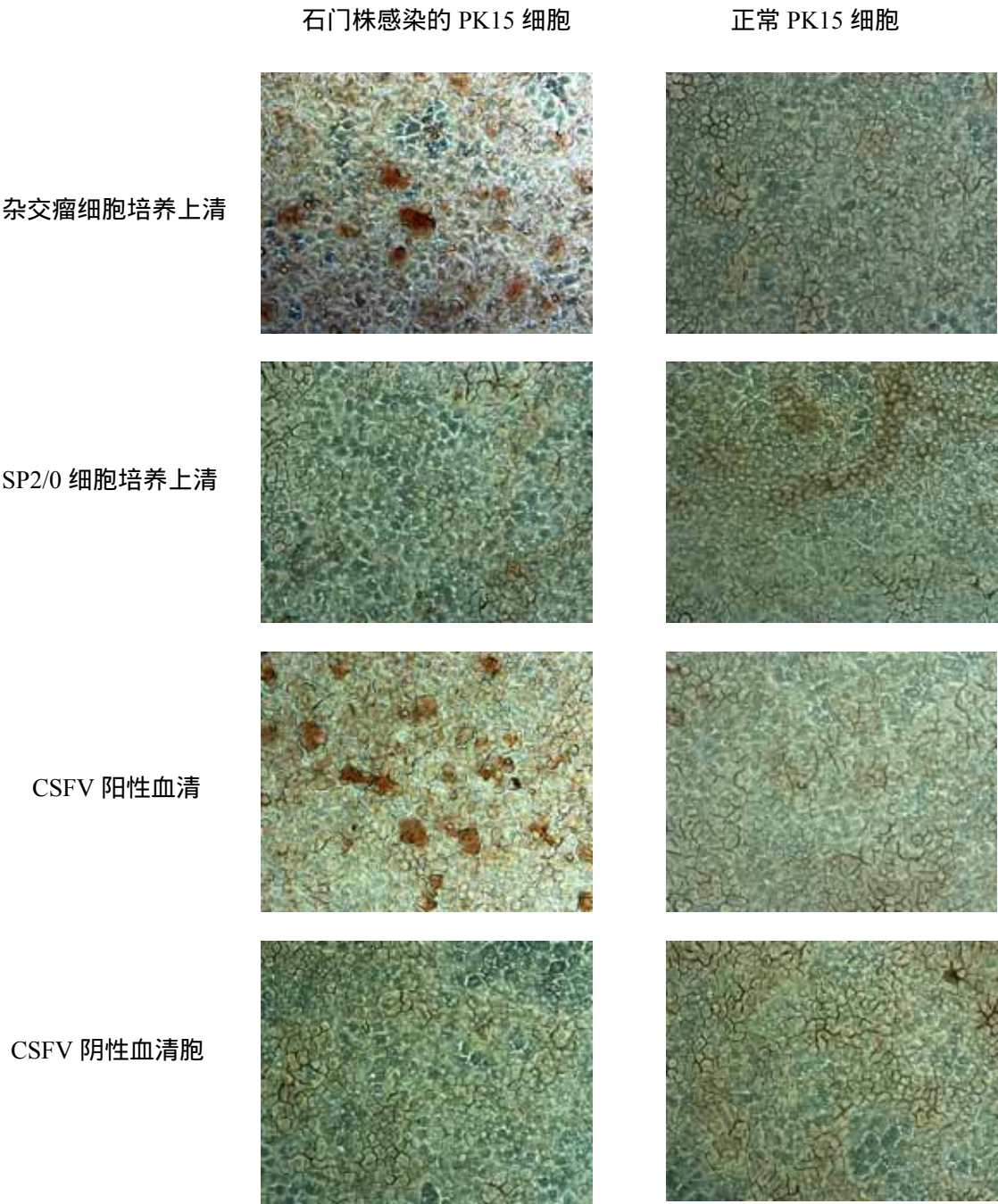


图 3-4 McAb 与猪瘟病毒石门株感染 PK15 细胞的 IPMA 反应结果  
Fig. 3-4 Detection of PK15 cells infected with CSFV Shimen strain using the anti-E2  
McAb by IPMA



3.2.4 单克隆抗体能够识别杆状病毒表达的重组 E2 蛋白

用纯化的杆状病毒表达的重组E2蛋白（分泌表达）和100×稀释的sf9细胞培养上清包被酶联反应板，进行间接ELISA试验，结果显示，单克隆抗体能够与CSFV E2蛋白发生特异性反应，见图3-5。

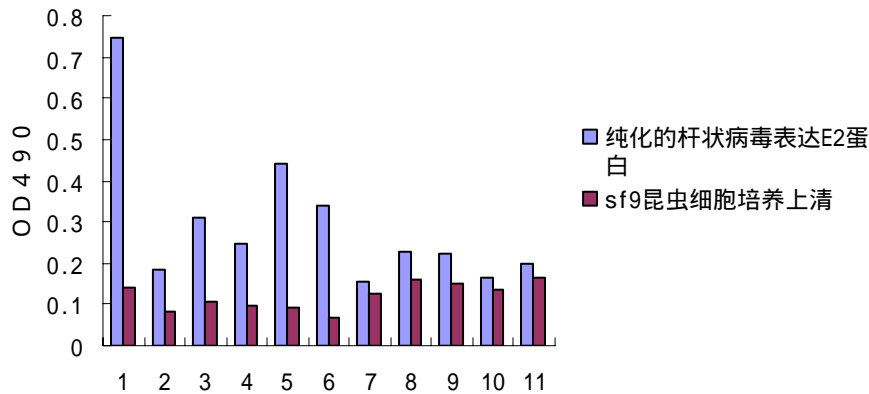


图 3-5 McAb 与杆状病毒表达 E2 蛋白的 ELISA 反应结果

Fig. 3-5 Reactivity of the anti-E2 McAb with recombinant E2 protein expressed in sf9 cells in indirect ELISA

1、2、3、4、5 分别为不同猪只的猪瘟病毒阳性血清；6 为杂交瘤细胞培养上清；7、8、9、10、11 分别为不同猪只的猪瘟病毒阴性血清

通过Western blotting分析表明，单克隆抗体能够与昆虫细胞表达的CSFV E2蛋白发生特异性反应（见图3-6），同时也证明单克隆抗体针对的是CSFV E2蛋白上的某个线性表位。

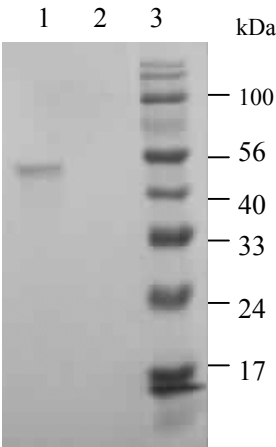


图 3-6 McAb 与杆状病毒表达的 CSFV E2 蛋白的 Western blotting 反应结果

Fig. 3-6 Reactivity of the anti-E2 McAb with recombinant E2 protein expressed in sf9 cells in Western blotting

1. 感染表达 CSFV E2 蛋白的重组杆状病毒的 sf9 昆虫细胞；  
2. 正常 sf9 昆虫细胞；  
3. 蛋白质分子量标准；

### 3.2.5 单克隆抗体属于 IgG1 亚型

按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明对得到的单克隆抗体进行了亚型鉴定,结果证实,所得单克隆抗体重链为IgG1亚型,轻链为  $\kappa$  链。

## 3.3 讨论

19世纪末,科学家发现的白喉毒素宣告第一代抗体诞生,随着现代免疫学、细胞生物学和分子生物学的不断研究发展,第二代抗体—单克隆抗体、第三代抗体-基因工程抗体分别于1975年和1984年问世(Sang et al, 2004)。1975年Kohler和Milstein首先报道用细胞杂交技术使绵羊红细胞(SRBC)免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合(Pluckthun et al, 1992),建立起第一个B细胞杂交瘤细胞株,并成功地制得抗SRBC的单克隆抗体。随着生物技术的发展,单克隆抗体在疾病诊断和治疗方面的作用越来越受到人们的重视。在同种异体免疫排斥、自身免疫反应抑制、抗血小板治疗、癌症治疗、感染性疾病治疗等方面应用最为广泛(Xiao et al, 2004),迄今全世界已研制成数以千计的单克隆抗体。

在病毒学研究中,单克隆抗体对病毒的生物学特性、抗原性研究,以及对病毒性疾病的诊断、治疗、免疫机制研究和流行病学调查均具有重要的意义。传统的单克隆抗体制备方法是利用天然病毒作为抗原免疫动物,如以往抗CSFV的单克隆抗体用PK15等敏感细胞的培养物免疫小鼠来制备,由于CSFV不易培养,再加上病毒浮密度小,难以纯化,而且用病毒的细胞培养物纯化后免疫小鼠,又产生抗许多细胞成分的抗体,从而使融合后筛选困难(Wensvoort et al, 2001)。

原核表达系统虽然没有蛋白翻译后的糖基化、磷酸化等加工修饰功能,不能完全反映蛋白的天然构象,但是原核表达系统作为一种成熟的、方便快捷的蛋白表达系统是研究各种生物体中基因功能、建立临床检测方法的有效手段。另外人们还采取各种方式如密码子优化、改造基因工程大肠杆菌等来提高原核表达的效率 and 表达产物的质量,所以原核表达在研究基因与蛋白之间的功能、建立快速简便的临床检测方法、研究病原体的致病机制等方面占有不可或缺的地位。

E2,又称为gp55,是CSFV的主要保护性抗原蛋白,其在猪瘟病毒多聚蛋白上的位置始于氨基酸残基690,终止于氨基酸残基1063,长370个氨基酸。利用单抗竞争结合和抗原捕捉试验对E2蛋白的抗原结构分析的结果表明,E2蛋白上存在4个抗原区,即A~D,所有这4个区均位于E2蛋白N端氨基酸残基690~866之间,而C端氨基酸残基866~1007之间的部分都不是其抗原表位必需的,不参与这些表位构象的形成,因此氨基酸残基690~866的部分似乎是E2蛋白最具抗原性的部分。

在本研究利用具有生物学活性的tE2蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠,然后制备了一株能稳定分泌特异性针对CSFV E2蛋白的杂交瘤细胞。首先,通过单克隆抗体与带有组氨酸标签

猪IFN- $\gamma$ 的间接ELISA反应结果显示,单克隆抗体只与免疫原(tE2蛋白)发生特异性反应,而与带有组氨酸标签的猪IFN- $\gamma$ 不反应,说明单克隆抗体针对的是所表达tE2蛋白,而非重组蛋白上的组氨酸标签;通过与CSFV C株的间接ELISA反应和酶联免疫单层吸附试验(IPMA)证明,所制备的单克隆抗体能够特异性识别天然的猪瘟病毒粒子,可用于猪瘟病毒的检测;通过与杆状病毒表达的猪瘟病毒E2蛋白的间接ELISA反应和Western blotting分析,从另一个角度进一步证明单克隆抗体能够与CSFV E2蛋白发生特异性反应,并且单克隆抗体能够与变性的E2蛋白反应,说明单克隆抗体所结合的是CSFV E2蛋白上的线性表位,同时也证明CSFV E2蛋白上存在线性表位;因此,所制备的单克隆抗体可用于猪瘟病毒的检测和猪瘟病毒E2蛋白的结构、功能研究。

在单克隆抗体与CSFV C株的ELISA反应中,我们发现单抗的OD值要比猪瘟阳性血清的OD值低,造成这种情况的原因可能是由于原核表达系统缺少翻译后的糖基化、磷酸化等修饰功能,导致原核表达的tE2蛋白与天然的CSFV E2蛋白在生物学活性方面有一定的差异;另一方面,天然的CSFV E2蛋白具有一定的立体空间结构,并且通常E2和E1以异源二聚体的形式存在,而截短的E2蛋白没有天然CSFV E2蛋白那么长的肽链,也没有CSFV E1蛋白协助构成复杂的空间结构,导致tE2蛋白的抗原性有所下降;所以单克隆抗体与猪瘟病毒的亲和性有所下降是可以理解的。

总之,本研究利用原核表达的CSFV tE2蛋白成功制备了一株能够高效分泌特异性针对CSFV E2蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞,为以后猪瘟病毒检测方法的建立和对猪瘟病毒E2蛋白的结构、功能研究等提供了条件和基础。

## 第四章 结 论

4.1 用大肠杆菌高效表达了猪瘟兔化弱毒疫苗株 E2 蛋白主要抗原区 ,表达的重组蛋白能被猪瘟病毒抗血清所识别。

4.2 利用纯化的重组蛋白作为免疫原 ,免疫 BALB/c 小鼠 ,采用 PEG 融合的方法制备了一株分泌抗猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞 ;经鉴定 ,该株单克隆抗体能够特异性地与猪瘟病毒 C 株和石门株结合 ,针对 E2 蛋白上的线性表位 ,抗体分子重链为 IgG1 型 ,轻链为 型。

## 参考文献

1. 李成等, 应用电镜技术对猪瘟病毒的研究. 中国兽医科技, 1989, 7: 24-25
2. 刘湘涛, 韩雪清, 刘伯华等, 猪瘟流行毒E<sup>ms</sup>基因的序列分析. 中国农业科学, 2000, 33(4): 75-81
3. 马刚, 李作生, 余兴龙等, 猪瘟病毒保护性抗原 E2 蛋白的制备及其抗原表位的初步分析. 中国兽医学报, 2003, 22(2): 121-123
4. 善谦, 王洪海, 朱乃硕等主编. 免疫学导论(第一版). 高等教育出版社, 施普林格出版, 1999, 7
5. 王在时, 邱惠深, 猪瘟单抗诊断试剂的推广及应用. 中国兽医杂志, 1995, 129(4): 22-26
6. 王镇, 阎光伟, 李明义等, 猪瘟病毒的形态结构与形态发生. 微生物学报, 2000, 40(3): 237-242
7. 肖昌, 余兴龙, 张茂林等, 利用随机肽库鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 449-453
8. 肖明, 张楚瑜, 祝志展等, 猪瘟病毒基因组非编码区的定性定量与结构分析. 科学通报, 2001, 46: 544-551
9. 殷震, 刘景华, 动物病毒学(第2版). 科学出版社, 1997
10. 周宗安, 刘劲松, 猪瘟病毒单克隆抗体的研制和应用. 兽医大学学报, 1989, 9(3): 242-245
11. 朱立平, 陈学清, 免疫学常用实验方法(第1版). 人民军医出版社, 2000
12. Behrens S.E, Grassmann C.W., Thiel H.J.et al., Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. J Virol 1998, 72: 2364-2372.
13. Brown E.A., Zhang H., Ping L., Lemon S.M., Secondary structure of the 5'nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. Nucl Acids Res 1992, 20: 5041-5045.
14. Bruschke M., Hulst M.M., Moormann J.M.et al., Glycoprotein E<sup>ms</sup> of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. J Viro1 1997, 71: 6692-6696.
15. Clavijo A., Lin M., Riva J.et al, Development of a competitive ELISA using a truncated E2 recombinant protein as antigen for detection of antibodies to classical swine fever virus. Res Vet Sci 2001, 70: 1-7.
16. Darbyshire J.H., A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. Vet Rec 1960, 72: 331.
17. Deng R., Brock K.V., 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. Nucl Acids Res 1993, 21: 1949-1957.
18. Dewulf J., Koenen F., Mintiens K.et al, Analytical performance of several classical swine

- fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *J Virol Methods* 2004, 119: 137-143.
19. Elbers K., Tautz N., Becher P. et al, Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* 1996, 70: 4131-4135.
  20. Elisenda A., Wiesmuller K.H., Wienhold D. et al., Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol* 2002, 83: 551-560.
  21. Freitas T.R., Caldas L.A., Rebello M.A., Protaglandin A1 inhibits replication of classical swine fever virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93(6): 815-818.
  22. Fritzemeier J., Teuffert J., Greiser-Wilke I. et al, Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol* 2000, 77: 29-41.
  23. Fryxell K.B., O' Donoghue K., Graeff R.M. et al., Functional expression of soluble forms of human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 1995, 6:329-336.
  24. Fuqiang Z., Zhihua L., Nianzu Z., Identification and comparison of neutralizing epitopes of glycoprotein E<sup>ns</sup> of classical swine fever virus. *Acta Microbiol Sinica* 2005, 45(1): 66-72.
  25. Gachhui R., Presta A., Bentley D.F. et al., Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methyotrophic yeast. *J Biol Chem* 1997, 271: 20:594-602.
  26. Gallei A., Rumenapf T.R., Thiel H.J., Characterization of helper virus-independent cytopathogenic classical swine fever virus generated by an in vivo RNA recombination system. *J Virol* 2005, 2440-2448.
  27. Genghini R., Tiranti L., Wittouck P., Pig chromosome aberrations after vaccination against classical swine fever in field trials. *Vaccine* 2002, 20: 2873-2877.
  28. Greiser W.I., Moening V., Coulibalyc T. et al., Identification of conserved epitopes on a Hog Cholera Virus protein. *Arch. Virol* 1990, 111:213-225.
  29. Hahn J., Park S.H., Song J.Y. et al, Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever E2 protein. *J Virol Meth.* 2001, 93: 49-56.
  30. Handel K., Kehler H., Hills K. et al, Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus. *J Vet Diagn Invest* 2004, 16: 132-138.
  31. Hanson R.J., Origin of hog cholera. *J Am Vet Med Assoc* 1957, 131:211 -218.
  32. Harkness J.W., Classical swine fever and its diagnosis: A current view. *Vet Rec* 1985, 16:288.
  33. Hofmann M.A., Bassy S., Classical swine fever in 1993 in Switzerland: molecular epidemiologic characterization of the virus isolate. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1998, 140: 365-370.

34. Hulst M.M., Moormann R.M., Inhibition of pestivirus infection in cell culture by proteins receptors  $E^{ms}$  and E2 of classical swine fever virus:  $E^{ms}$  and E2 interact with envelope different. J Gen Virol 1997, 78: 2779-2789.
35. International Animal Health Code.1998, edition part 2, chapter 2.1.1
36. Jensen M.H., Detection of antibodies against Hog Cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. Acta Vet Scand 1981, 22: 85-98.
37. Jerva L.F., Sullivan G., Lolis E., Functional and receptor binding characterization of recombinant murine macrophage inflammatory protein 2 sequence analysis and mutagenesis identify receptor binding isotopes. Protein Aci 1997, 6:1643-1652.
38. Kabin G., In vitro merkmale des schweinepestivirus. Zentralbl Veterinarmed [B] 1967,14: 543.
39. Kohler G., Milstein R., Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 256: 495-497.
40. Kolupaera V.G., Pestova T.V., Hellen C.U., Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. RNA 2000, 6(12): 1791-1807.
41. Kosmidou F.V., Aht H.J.,Thiel E.et al, Differentiation of classical swine fever virus strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins.Vet Microbiol 1995, 47: 111-118.
42. Lee K.J., Choi J., Ou, J.H., Lai M.M., The C-terminal transmembrane domain of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase is essential for HCV replication in vivo. J Virol 2004, 78: 3797-3802.
43. Lee S.M., Susan K., Schommara B., Kleiboekera S., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes .Vet Immun and Immunopath 2004, 102: 217-231.
44. 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 Vrol 2000, 74(24):11619-11625.
45. Lin M., Trottier E and Pasick J., Antibody responses of pigs to defined  $E^{ms}$  fragments after infection with classical swine fever virus. Clin.Diagn. Lab. Immunol 2005, 12: 180–186.
46. Lin M., Trottier E., Pasick J.et al.,Identification of anti-genic regions of the  $E^{ms}$  protein for pig antibodies elicited during classical swine fever virus infection. J. Biochem 2004, 136: 795–804.
47. Lowings J.P., Paton D.J., Sands J.J.et al., Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between isolates. J Gen Virol, 1994, 75:3461-3468.
48. Lowings P, Ibata G, Mia D.et al., Classical swine fever in Sardinia epidemiology of recent

- outbreaks. *Epidemiol Infect* 1999, 122:553-559.
49. Maddy V., Wensvoort G., Kluiver E.D. et al., Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* 1991, 65:1179-1182.
50. Meng Y., Linfa W., Brian S et al., Mapping of a C-Terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses. *J Virol* 1996, 222: 289-292.
51. Meyers G., Saalmuller A., Buttner M., Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E<sup>ms</sup> of the pestivirus classical swine fever virus. *J Virol* 1999, 73(12): 10224-10235.
52. Meyers G., Thiel H.J., Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J Virol* 1995, 69: 3683-3689.
53. Meyers G., Thiel H.J., Molecular characterization of pestivirus. *Adv Virus Res* 1996, 47:53-118.
54. Min L., Trottier E and Mallory M., Enzyme-Linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins E<sup>ms</sup> and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection. *Clinic and Diagnostic Lab Immunol* 2005, 12(7): 877-881.
55. Ming x., Jufang G., Wei W., Yujing W. et al, Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome. *Eur J Biochem* 2004, 271: 3888-3896.
56. Mittelholzer C., Moser C., Tratschin J.D. et al., Porcine cells persistently cytopathic infected with classical swine fever virus protected from pestivirus-induced effect. *J Gen Virol* 1998, 79: 2981-2987.
57. Moennig V., The hog cholera virus. *Immun. Microbiol Infect Dis* 1992, 15(3):189-201
58. Moormann R.J., Van Gennip H.G., Miedema G.K. et al, Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol* 1996, 70:763-770.
59. Moser C., Stettler P., Tratschin J.D. et al., Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol* 1999, 73(9): 7781-7794.
60. Moser C., Stettler P., Tratschin J.D. et al., Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol* 1999, 73(9): 7781-7794.
61. Paton D.J., Goldrick A., Greiser W.I. et al., Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 2000, 73(2-3): 135-157.
62. Pluckthun A., Mono- and bivalent antibody fragment produced in *E. coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol Rev* 1992, 130: 151.
63. Rijnbrand R., Bredenbeek P.J., Haasnoot P.C. et al., The influence of downstream



- protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other lavivirus RNAs. *RNA*, 2001, 7(4): 585-597.
64. Rijnbrand R., Straaten T., Van Rijn P.A. et al., Internal entry of ribosomes is directed by the 5' non-coding region of classical swine fever virus and dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* 1997, 71(1): 451-457.
65. Risatti G.R., Borca M.V., Kutish G.F. et al., The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J Virol* 2005, 3787-3796.
66. Ruggli N., Tratschin J.D., Mittelholzer C. et al, Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* 1996, 70: 3478-3487.
67. Rumenapf T., Stark R., Heimann M. et al., N-terminal proteinase of pestivirus: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol* 1998, 72(3): 2544-2547.
68. Rumenapf T., Unger G., Strauss J.H. et al., Processing of the envelope glycoproteins of estiviruses. *J Virol* 1993, 67: 3288-3294.
69. Rumenapf T.R., Stark G., Meyers T. et al., Structural protein of Hog Cholera Virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 1991, 65: 589-597.
70. Schneider R., Unger G., Stark R. et al., Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 1993, 261:1169-1171.
71. Sizova D.V., Kolupueva V.G., Peston T.V. et al., Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus. *J Virol* 1998, 72(6):4775-4782.
72. Stadejek T., Vilcek S., Lowings J.P. et al., Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in central Europe. *Virus Res* 1997, 52:195-204.
73. Stark R., Meyers C., Rumenapf T., Thiel H.J., Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* 1993, 67: 7088-7095.
74. Steffeus S., Thiel H.J., Behrens S.E. et al., The RNA-dependent RNA polymerase of different members of the family flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol* 1999, 80: 2583-2590
75. Terpstra C., Wensvoort G., The protective value of vaccine induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet Microbiol* 1998, 16: 123-128.
76. Thiel H.J., Stark R., Weiland E. et al., Hog Cholera Virus: molecular composition of virion from a pestivirus. *J Virol* 1991, 65: 4705-4712.
77. Thiel H.J., Meyers G., Stark R. et al., Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).

- Arch Virol Suppl 1993, 7: 41-52.
78. Tratschin J.D., Moser C., Ruggli N.et al., Classical swine fever virus leader proteinase N<sup>pro</sup> is not required for viral replication in cell culture. J Virol 1998, 72(9): 7681-7684.
79. Trautwein G., Pathology and pathogenesis of the disease. Martins Nijhoff publishing, Boston, USA, 1988, 27-54.
80. Ulst M.M., Panoto F.E., Hoekman A.et al., Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E<sup>ms</sup> of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. J Virol 1998, 72(1): 151-157.
81. Van Gennip H.G.P., Van Rijn P.A., Widjoatmodjo M.N et al, Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E<sup>ms</sup> or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. Vaccine 2001, 19: 447-459.
82. Van Rijl M., Wensvoort G., Kluyver E.et al., Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. J Virol 1991, 65: 2761-2765.
83. Van Rijn P.A., Miedema G.K.W., Wensvoort G.et al., Antigenic structure of envelope enveloprotein E1 of hog cholera virus. J virol 1994, 68(6): 3934-3942.
84. Van Rijn P.A., Van Gennip H.G.P.et al., A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia. Vet Microbiol 1992, 33: 221-230.
85. Van Rijn P.A., Van Gennip H.G.P.et al., Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus strain Brescia. J. Gen Virol 1993, 74: 2053-2060.
86. Van Rijn P.A., Van Gennip H.G.P.et al., Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brecia. J Gen Virol 1993, 74: 2053-2060.
87. Van Rijn P.A., Van Gennip H.G.P., Moormann R.J.M., An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV). Vaccine 1999, 17: 433-440.
88. Van Rijn P.A.et al., Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus. J Virol 1994, 7: 3934-3942.
89. Vandeputte J., Too H.L., Fook K.et al, Adsorption of colostral antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs. J Vet Res 2001, 62: 1805-1811.
90. Vilcek S., Paton D.J., Application of genetic methods to study the relationship between classical swine fever virus outbreaks. Res Vet Sci 1998, 65: 89-90.
91. Vlasova A., Risatti G., Grebennikova T.et al, Infectious genomic copy of the Russian vaccine strain of classical swine fever (hog cholera) virus. In: Proceedings of the International Pigs Veterinary Society, Ames, 2002, 323.

92. Warrener P., Collectt M.S., Pestivirus NS3 (P80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol* 1995, 69(3): 1720-1726.
93. Welland E., Ahl R., Stark R.et al., A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus Hog Cholera Virus. *J Virol* 1992, 66: 3677-3682.
94. Welland E., Stark R., Haas B.et al., Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 1990, 64: 3563-3569.
95. Wenavoort G.C., Terpstra C., Bloemraad I.et al., Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet Microbiol* 2001, 12: 101-108.
96. Wensvoort G., Terpstra C., de Kluijver E.P.et al, Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet Microbiol* 1989, 21: 9-20.
97. Wensvoort G., Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1989, 70: 2865-2876.
98. Wensvoort G., Bloemraad M., Terpstra C., An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 1988, 17: 129-140.
99. Wiskerchen M., Belzer S.K., Collett M.S., Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* 1991, 65(8): 4508-4514.
100. Wu H., Zhang C., Zheng C.et al, Construction of cytopathic PK-15 cell model of classical swine fever virus. *Chin Sci Bull* 2003, 48: 887-891.
101. Yu X.L., Tu C.C., Li H.W.et al., DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine* 2001, 19(11-12): 1520-1525.
102. Xiao Z., Batista L., Dee S.et al, The level of virus-specific T-Cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 2004, 78(11): 5923-5933.

## 致 谢

值此论文完稿之际，首先衷心感谢我的导师仇华吉研究员三年来的殷切教诲和悉心栽培。正是仇老师的统筹安排和精心指导，才使我能够顺利完成本论文的研究和撰写工作。导师严谨、认真的治学态度，勇于创新的精神，以及对科研事业忘我追求的精神，永远是我学习的典范和努力的方向。三年来，导师对我的科研工作高标准、严要求、鼓励我在工作中追求本领域研究的制高点，使我在学习中得到不断的提高，感激之情难以言表，我将永远铭记在心。

向兽医生物技术国家重点实验室实验室主任董光志研究员表示深深的谢意与崇高的敬意，感谢他所提供的良好的实验条件及宽松、民主、自由、互助的学习环境。

衷心感谢王云峰副研究员、王玫助理研究员、姜红女士和赵和老师在本实验中提出的有益建议和无私帮助表示衷心的感谢。

对本实验室的周艳君老师、田志军老师、华荣虹老师、彭金美老师、石星明老师在实验完成过程中的关心和帮助表示衷心的感谢；同时对在一起学习的李娜博士、李国新博士、贺云霞博士、刘燕博士、孙惠玲博士、侯绍华博士、周伦江博士、郑宝亮博士、张强博士、元文宝博士、闫丽萍博士、侯艳红博士、安同庆博士、于海博士、李艳硕士、彭伍平硕士、韩成钢硕士、赵建军硕士、王明杰硕士、王忠华硕士、高辉硕士、卢宝伟硕士、杨春富硕士、余斌硕士、刘益民硕士、鲁山硕士、都兴洋硕士、何来硕士、崔红玉硕士、贺笋硕士、木古丽硕士、金迪硕士的支持和帮助表示真诚的感谢。

感谢科研处的王笑梅研究员、孙百明老师的关心和帮助。

感谢于茂荣硕士、周玉长硕士在日常生活中给予的帮助和支持。

对仪器室的徐哮老师、王岳老师以及兽医生物技术国家重点实验室各位老师和同学在学习和生活上给予的帮助表示感谢。

感谢中国农业科学院研究生院有关老师的帮助和支持。

在硕士生活即将结束之际，深深的爱意献给深切理解我、爱护我，在我生活中永远鼓励我、支持我的父亲、母亲和弟弟。

本研究得到了“973”计划重大专项“动物重大传染病病原变异与致病的分子机制”(项目编号2005CB523200)的资助。

## 作 者 简 历

侯 强，男，1980 年生，山东省泰安市宁阳县人，1998 年 9 月考入山东农业大学动物科技学院动物医学专业，2002 年 7 月毕业，获学士学位；2003 年 9 月考入中国农业科学院研究生院，攻读硕士学位，研究方向为分子病毒学与免疫学，师从仇华吉研究员。

硕士论文题目是：猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区的表达及其单克隆抗体的制备，论文完成于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室。