

潘梦娇, 刘德鹏, 郭磊, 等. 伪狂犬病病毒 VP22 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 82-89.

PAN M J, LIU D P, GUO L, et al. Monoclonal antibodies preparation and antigenic epitope identification of VP22 protein of pseudorabies virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 82-89.

伪狂犬病病毒 VP22 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定

潘梦娇, 刘德鹏, 郭磊, 赵桐, 白娟, 姜平, 刘星*

(南京农业大学/农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 为制备伪狂犬病病毒 (PRV) VP22 蛋白单克隆抗体, 将目的基因克隆至原核表达载体 pET-28a (+), 构建 pET-28a-VP22 原核表达质粒, 并利用大肠杆菌表达系统, 获得重组 VP22 蛋白。将纯化后的蛋白免疫 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠, 通过杂交瘤细胞融合技术及间接 ELISA 方法筛选, 经 3 次亚克隆后获得 4 株 PRV VP22 蛋白的单克隆抗体 1D6、1D9、1B12 和 2C10。间接 ELISA 检测 4 株杂交瘤细胞传至 15 代均能稳定分泌抗体, 且细胞上清液抗体效价均为 1:6 400。经亚型鉴定, 4 株单克隆抗体的重链均是 IgG1 亚类, 轻链皆属于 κ 型。Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 结果表明, 制备的单克隆抗体均可与 PRV 发生特异性反应, 并鉴定出 2 个抗原表位; Western blot 和共聚焦试验结果表明, VP22 蛋白是病毒早期蛋白, 且早期存在于细胞质, 晚期移位至细胞核并在核中积累。本研究制备的单克隆抗体将为后续探索 PRV VP22 蛋白的功能提供材料支撑。

关键词: 伪狂犬病病毒; VP22 蛋白; 单克隆抗体; 抗原表位

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0082-08

Monoclonal antibodies preparation and antigenic epitope identification of VP22 protein of pseudorabies virus

PAN Mengjiao, LIU Depeng, GUO Lei, ZHAO Tong, BAI Juan, JIANG Ping, LIU Xing*

(Nanjing Agriculture University/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to prepare monoclonal antibodies against VP22 protein of pseudorabies virus (PRV), the target gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a (+), and the pET-28a-VP22 prokaryotic expression plasmid was constructed. The recombinant VP22 protein was obtained by using the *E. coli* expression system. Then, 6-8 week-old female BALB/c mice were immunized with the purified protein, and four monoclonal antibodies 1D6, 1D9, 1B12 and 2C10 to the PRV VP22 protein were obtained after three rounds of sub-cloning by means of hybridoma cell fusion and indirect ELISA. Indirect ELISA detected that 4 hybridoma cells were able to stably secrete antibodies till the 15th generation, and the antibody titer of the cell supernatant was 1:6 400. According to the subtype identification, the heavy chains of the four monoclonal antibodies belonged to IgG1, and the light chains were the κ type. The results of Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) showed that all the monoclonal antibodies prepared in this study could react specifically with PRV and identify two epitopes. Meanwhile, the results of Western blot and confocal microscopy showed that the VP22 protein was a viral early protein, early presenting in the cytoplasm and late infection translocating to and accumulating in the nucleus. In this study, the monoclonal antibodies against the VP22 protein of PRV provided technical support for further exploration of the biological function and virulence mechanism of the protein.

Keywords: pseudorabies virus; VP22 protein; monoclonal antibody; antigenic epitope

伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科^[1], 可感染多种家畜及

野生动物, 引起以发热、奇痒及脑脊髓炎为特征的急性传染病^[2]。

猪是 PRV 的天然宿主^[3], 不同阶段猪群感染该病毒后均会出现严重的临床症状^[4], 如妊娠母猪出现流产和死胎, 成年猪出现呼吸症状, 新生仔猪出现发热、特征性中枢神经系统症状^[5], 给我国养猪产业造成了巨大的经济损失。

PRV 是一种线性双链 DNA 病毒, 基因组全长约

收稿日期: 2023-08-14; 修回日期: 2024-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272985); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-35)

第一作者: 潘梦娇, 女, 硕士

*通信作者: 刘星, 教授, 主要从事动物传染病学的工作与研究

工作, E-mail: xingliu@njau.edu.cn。

为 150 kb, 可编码约 100 种蛋白, 成熟的病毒粒子含约 50 种蛋白^[6]。已有研究表明, PRV UL49 基因编码的被膜蛋白 VP22 与病毒毒力密切相关, 在病毒感染复制过程中发挥重要作用^[7]。因此, 本研究以原核表达的重组 VP22 蛋白为免疫原制备单克隆抗体, 旨在为未来研究 VP22 蛋白的功能提供支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料

SP2/0 骨髓瘤细胞、Vero 细胞、HEK293T 细胞、原核表达载体 pET-28a (+)、大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 (DE3) 和 PRV ZJ01 毒株, 均由本实验室保存; 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠及 ICR 小鼠购自扬州大学实验动物中心; 病毒 DNA 提取试剂盒, 购自美国 Omega 公司; 2 \times Taq Plus Master Mix、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker 与 180 kDa Prestained Protein Marker, 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Fast Digest BamH I、Hind III 和 T4 DNA Ligase, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; RPMI-1640 培养基, 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 购自南京森贝伽生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), 购自碧云天生物技术有限公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC)-羊抗鼠 IgG (H+L) 和小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, 购自 Proteintech 生物技术有限公司; ECL 化学发光底物试剂盒, 购自天能科技有限公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、HAT 和 HT, 均购自美国 Sigma 公司; 其他常规试剂皆是国产分析纯。

1.2 重组质粒的构建

根据 PRV ZJ01 毒株 (GenBank: KM061380.1) VP22 基因组序列, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物并在上下游引物中分别加入酶切位点 BamH I 和 Hind III, 设计上游引物 UL49-BamH I -F: 5'-AATG-GATCCATGTCCAGCTCGAGAAAGACCCGGG - 3', 下游引物 UL49-Hind III -R: 5'-GCAAAGCTTTTATACACTTTTCCCTTCCGCCCC - 3'。利用实验室保存的 PRV ZJ01 毒株提取病毒 DNA, 以其为模板进行 PCR 反应, 胶回收后获得目的片段。将经 BamH I 和 Hind III 双酶切后的目的片段与 pET28a (+) 载体进行连接及转化。菌液 PCR 和双酶切鉴定后, 若结果显示正确, 则成功构建出重组质粒 pET-28a-VP22。

1.3 重组蛋白的表达与纯化

将成功构建的重组质粒 pET-28a-VP22 转化至 BL21, 后挑取单菌落接种至含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C 160 r/min 摇床中培养 2~3 h, 至菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 值达到 0.6~0.8, 加入终浓度是 0.8

mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h 后收集表达菌体。使用超声细胞破碎仪对菌体进行超声裂解后, 4 $^{\circ}$ C 离心收取上清液与沉淀制备蛋白样品。利用 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白表达形式, 并采用镍柱亲和层析法纯化重组 VP22 蛋白^[8]。将纯化后的重组蛋白进行 Western blot 鉴定, 检测其纯化效果。

1.4 单克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫

首免时将重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混匀乳化, 以 50 μ g/只的免疫剂量, 采用皮下多点注射的方式免疫 3 只 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠。二免与三免皆采用弗氏不完全佐剂乳化, 每间隔 3 周免疫 1 次^[9]。三免后 10 d, 断尾采血获得免疫小鼠血清, 以用于小鼠多抗血清效价的测定。于细胞融合前 3 d, 选择腹腔注射 100 μ g VP22 重组蛋白的方式对抗体效价大于 1:12 800 且效价最高的小鼠进行冲击免疫。

1.4.2 细胞融合与筛选

细胞融合时断颈处死小鼠, 无菌分离脾细胞, 使用融合剂 PEG4000 将脾细胞与骨髓瘤细胞以 7:1 的比例进行融合。待融合细胞于 HAT 选择培养基中培养 10 d 后, 用间接 ELISA 检测细胞上清液, 筛选阳性克隆。同时通过有限稀释法进行数次亚克隆, 当杂交瘤细胞上清液检测结果全部为阳性时, 便可将稳定分泌抗体且抗体分泌能力最强的阳性单克隆扩大培养后分批次冻存于液氮。

1.4.3 间接 ELISA 测定抗体效价

将重组蛋白 pET-28a-VP22 以 2 μ g/mL 的浓度包被酶标板, 以待检杂交瘤细胞上清液为一抗, HRP-羊抗鼠-IgG 为二抗; 同时设置 SP2/0 上清液、免疫小鼠的多抗血清为阴性、阳性对照。用酶标仪测定每孔 $OD_{450\text{nm}}$ 值, 当待检样品 $OD_{450\text{nm}}$ /阴性对照 $OD_{450\text{nm}}$ (P/N) ≥ 2.1 时, 即判定该待检样品为阳性, 否则判为阴性。

1.4.4 腹水制备

对 6 周龄 BALB/c 雌鼠进行腹腔注射无菌液体石蜡, 剂量为 500 μ L/只。致敏 7 d 后, 每只小鼠腹腔内注射 (3~5) $\times 10^5$ 个杂交瘤细胞。观察到小鼠腹部膨大后, 采集腹水, 离心取上清液存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 单克隆抗体的鉴定

1.5.1 单克隆抗体分泌稳定性及腹水效价测定

将阳性杂交瘤细胞连续培养 15 代, 每隔 5 代收细胞上清液, 利用间接 ELISA 测定抗体效价, 确定其分泌抗体稳定性。同样, 使用建立的 ELISA 方法检测腹水抗体效价。

1.5.2 单克隆抗体的亚型鉴定

参考小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒的使用说明

书检测单克隆抗体亚型。

1.5.3 Western blot 鉴定

将 PRV ZJ01 毒株以感染复数 (MOI) 为 1 接种 HEK293T 细胞, 感染 12 h 后, 加入细胞裂解液, 制备蛋白样品, 同时设置未接毒 HEK293T 细胞作为阴性对照。将上述蛋白样品与纯化的 pET-28a-VP22 蛋白经 SDS-PAGE 后, 转印至 NC 膜上, 以制备的 4 株单克隆抗体腹水为一抗, 进行 Western blot 反应性鉴定。

1.5.4 间接免疫荧光 (IFA) 检测

将 PRV ZJ01 毒株以 MOI 为 1 的量接种 Vero 细胞, 培养 12 h 后 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤 3 次后用 0.1% Triton X-100 室温透膜 10 min, 使用 PBS 洗涤 3 次后用含 3% 牛血清白蛋白溶液进行封闭, 并以杂交瘤细胞上清液为一抗, 置于 37 °C 温箱孵育 1 h; 用 PBS 洗涤后加入稀释好的 FITC-羊抗鼠 IgG 避光作用 45 min, 再次洗涤后于荧光显微镜下观察荧光情况并拍照保存结果。

1.6 VP22 蛋白表达时间鉴定

取 PK15 细胞接种 MOI 为 3 的 PRV ZJ01 毒株, 分别于病毒感染 3、6、9、12 h 后裂解细胞收获蛋白样品, 将蛋白样品进行 SDS-PAGE, 随后转移至 NC 膜上, NC 膜用 5% 脱脂乳进行封闭, 以 VP22 单抗 1D9 及 VP16、gC 单抗作为一抗, 4 °C 孵育过夜, HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗, 室温孵育 1 h, 最后利用化学发光 (ECL) 成像仪进行显色。

1.7 VP22 蛋白的细胞定位

将 PRV ZJ01 毒株以 MOI 为 1 接种 PK15 细胞, 分别于感染 3、6、9、12 h 后用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 加入 0.1% Triton X-100 于室温作用 10 min, 随后以 PBS 洗涤 3 次并用含 3% 牛血清白蛋白溶液进行封闭, 以 VP22 1D9 单克隆抗体腹水为一抗, 37 °C 孵育 3 h, PBS 洗涤后加入 FITC-羊抗鼠 IgG 作用 1 h, 最后以 DAPI 染细胞核, 室温作用 5 min, PBS 再次洗涤后, 利用共聚焦显微镜观察 VP22 蛋白的细胞定位情况并保存结果。

1.8 单克隆抗体抗原表位的鉴定

根据 PRV ZJ01 毒株的 VP22 基因序列设计一系列截短体引物, 以构建的原核重组质粒 pET-28a-VP22 为模板, 利用 PCR 方法扩增多个 VP22 基因截短目的片段, 将截短片断分别克隆至原核表达载体 pET-28a (+), 构建重组质粒, 后转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 诱导表达重组蛋白。将各截短蛋白样品进行 SDS-PAGE, 以单抗腹水为一抗, 通过 Western blot 鉴定制备出的 4 株 VP22 蛋白单克隆抗体所针对的抗原表位。

1.9 VP22 蛋白抗原表位氨基酸位点比对分析

使用 BioEdit 软件对多个 PRV 毒株 VP22 蛋白的氨基酸序列进行比对, 并对鉴定出的 2 种 B 细胞抗原表位序列在 PRV 各毒株中的保守性进行分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增及重组质粒的构建

通过对 PRV VP22 基因进行 PCR 扩增后电泳回收 PCR 产物, 得到目的基因片段, 大小约为 741 bp, 与预期大小相符 (图 1A)。利用 *Bam*H I 与 *Hind* III 对重组质粒 pET-28a-VP22 进行双酶切鉴定, 结果如图 1B 所示, 酶切后的线性化质粒和目的片段大小与预期相符。

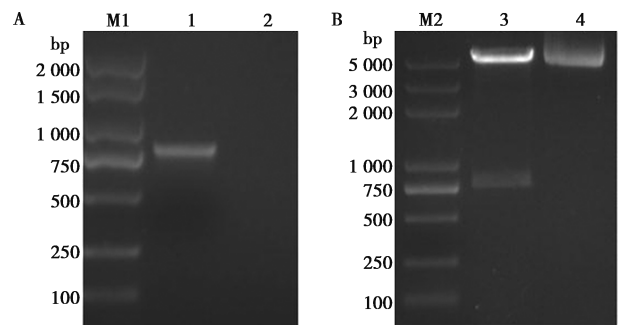


图 1 PRV VP22 基因 PCR 扩增 (A) 及重组质粒 pET-28a-VP22 酶切鉴定 (B)

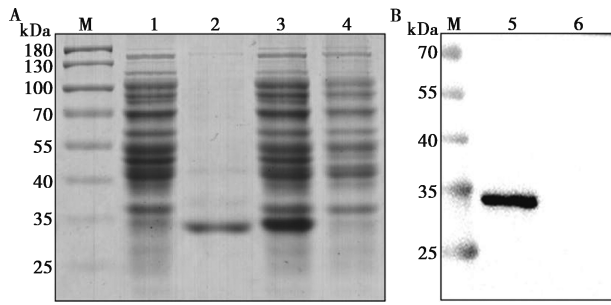
图 1 PRV VP22 基因 PCR 扩增 (A) 及重组质粒 pET-28a-VP22 酶切鉴定 (B)

2.2 重组蛋白表达、纯化及鉴定

SDS-PAGE 结果表明, 重组菌 BL21/pET-28a-VP22 经 IPTG 诱导后, 重组 VP22 蛋白成功表达, 大小约为 27 kDa, 且为包涵体表达 (图 2A)。采用镍柱亲和层析法纯化后得到目的蛋白。经 Western blot 鉴定, 重组蛋白能与 His 抗体反应, 而空载无特异性条带, 表明重组蛋白表达成功 (图 2B)。

2.3 单克隆抗体效价测定

利用间接 ELISA 方法于三免后 10 d 检测免疫小鼠的血清效价, 其效价皆高于 1 : 12 800。采选血清效价最高的小鼠制备 VP22 蛋白的单克隆抗体, 最终得到 4 株针对 PRV VP22 蛋白的阳性杂交瘤细胞, 命名为 1D6、1D9、1B12 和 2C10。将 4 株杂交瘤细胞连续传代至 15 代, 利用间接 ELISA 方法测定细胞上清液的抗体效价, 抗体分泌稳定。同时利用杂交瘤细胞制备腹水并检测其抗体效价, 结果如表 1 所示。



M. 蛋白质分子量 Marker; 1. 重组质粒表达菌上清液; 2. 重组质粒表达菌沉淀; 3. 重组质粒表达全菌; 4. 空载体诱导表达全菌; 5. 纯化的重组蛋白 pET-28a-VP22。

图2 重组蛋白 VP22 表达 SDS-PAGE 鉴定 (A) 和 Western blot 分析 (B)

表1 杂交瘤细胞上清液和腹水抗体效价测定

单克隆抗体	不同代次细胞培养上清液抗体效价			腹水效价
	P5	P10	P15	
1D6	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 204 800
1D9	1 : 800	1 : 800	1 : 6 400	1 : 204 800
1B12	1 : 800	1 : 800	1 : 6 400	1 : 12 800
2C10	1 : 400	1 : 1 600	1 : 6 400	1 : 25 600

2.4 单克隆抗体亚型鉴定

PRV VP22 蛋白单克隆抗体的亚型鉴定结果表明, 4 株单抗的重链属于 IgG1 亚类, 轻链均为 κ 型 (表 2)。

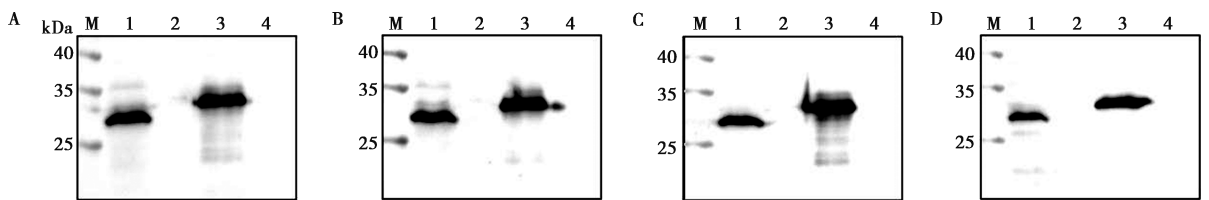
表2 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体	亚型和类							
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	κ	λ
1D6	2.179	0.061	0.047	0.051	0.060	0.067	1.803	0.044
1D9	2.112	0.051	0.045	0.055	0.068	0.066	1.811	0.055
1B12	0.866	0.052	0.045	0.051	0.051	0.066	0.535	0.061
2C10	2.014	0.060	0.048	0.039	0.059	0.047	0.705	0.049

2.5 单克隆抗体 Western blot 反应性鉴定

结果表明 (图 3), 4 株单克隆抗体皆可与 PRV 感染的 HEK293T 细胞及重组 VP22 蛋白发生特异性

反应, 而与 HEK293T 细胞和 pET-28a (+) 空载表达菌体蛋白不反应, 表明这 4 株单克隆抗体具有良好的特异性。



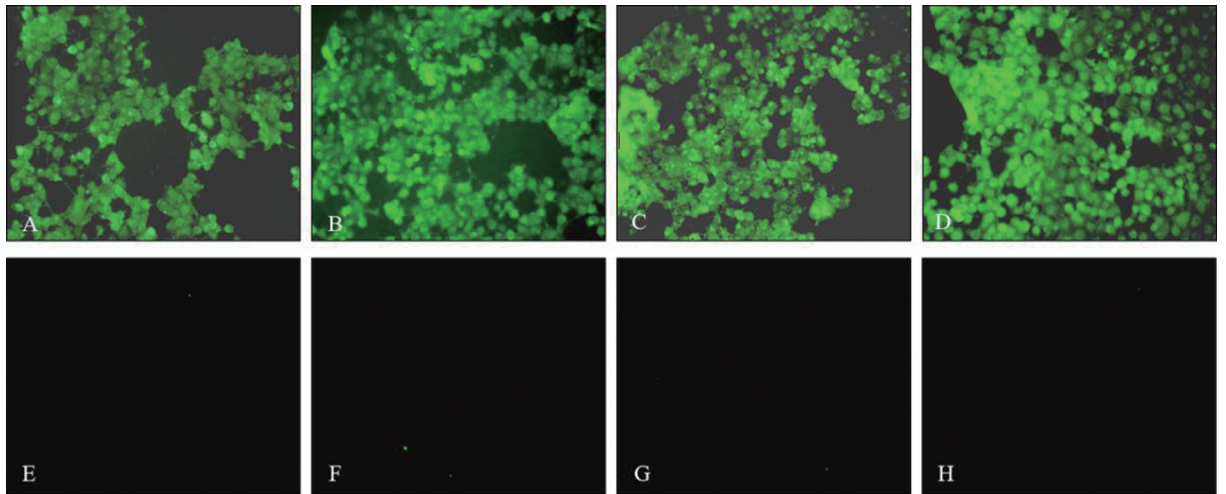
M. 蛋白质分子量 Marker; 1. PRV ZJ01; 2. HEK293T 细胞对照; 3. 重组 VP22 蛋白; 4. 空载诱导全菌蛋白。
A. 1D6; B. 1D9; C. 1B12; D. 2C10。

图3 4 株单克隆抗体与 PRV 和重组 VP22 蛋白的 Western blot 反应特性鉴定

2.6 单克隆抗体 IFA 特异性鉴定

IFA 鉴定结果见图 4, 4 株单克隆抗体皆与 PRV

感染的 Vero 细胞发生反应, 产生特异性的绿色荧光。



A. 1D6; B. 1D9; C. 1B12; D. 2C10; E~H. 阴性对照。

图4 VP22 蛋白单克隆抗体与 PRV 的 IFA 反应特性鉴定

2.7 VP22 蛋白表达时间鉴定

结果表明 (图 5), 病毒感染细胞 3 h 后便可检测到 VP22 蛋白, 同时参考早期蛋白 VP16 与晚期蛋白 gC 的表达情况, 揭示了 VP22 蛋白是病毒早期蛋白。

白。4 株单克隆抗体经两轮 Western blot 鉴定后, 可知 1D6、1D9 与 1B12 这 3 株单克隆抗体的抗原表位位于 VP22 蛋白 143~152 aa 区域内 (图 7B), 氨基酸序列为¹⁴³LDVGRRLAF¹⁵²; 2C10 所识别的抗原表位位于 203~212 aa 区域内 (图 7B), 氨基酸序列为²⁰³DAALDRFLQA²¹²。

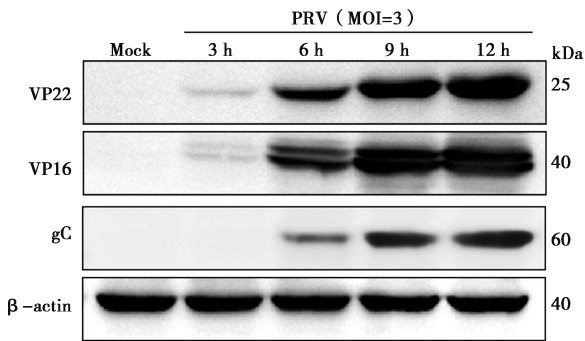


图5 病毒早期蛋白 VP22 的 Western blot 鉴定

2.8 VP22 蛋白的细胞定位分析

利用共聚焦显微镜观察 VP22 蛋白在细胞中的定位, 结果显示 (图 6), 蛋白 VP22 在细胞中处于动态分布, 其在病毒感染早期主要分布在细胞质中, 但在感染晚期迁移至细胞核并最终在核内积累。

2.9 单克隆抗体的表位鉴定

通过构建一系列 VP22 蛋白截短体, 并利用 Western blot 技术鉴定单克隆抗体 1D6、1D9、1B12、2C10 的抗原表位 (图 7A)。Western blot 结果显示, 截短体均与 His 单克隆抗体反应, 成功表达目的蛋

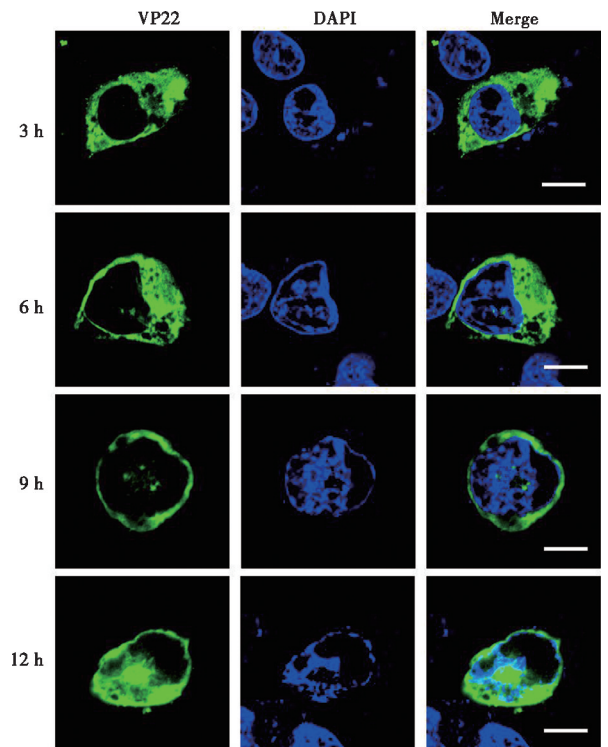
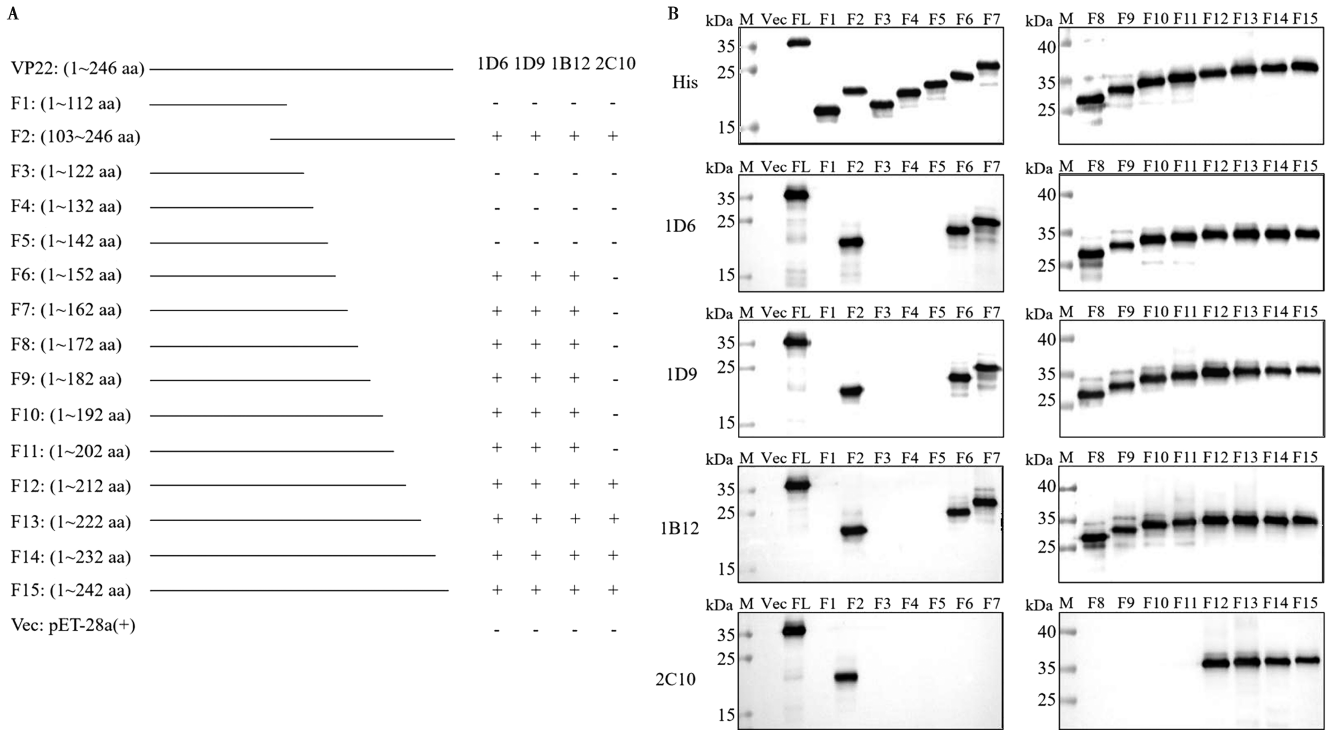


图6 蛋白 VP22 的细胞定位分析 (标尺=10 μm)



M. 蛋白质分子量 Marker; Vec. pET-28a (+); FL. pET-28a-VP22。

A. VP22 蛋白截短体; B. 单克隆抗体识别区域。

图7 PRV VP22 蛋白截短体构建模式图 (A) 及抗原表位鉴定 (B)

2.10 抗原表位空间结构特点

利用 Robetta 网站 (<https://robetta.bakerlab.org/>) 对 PRV VP22 蛋白建模, 预测 2 种抗原表位在 VP22 蛋白中的分布情况, 结果见图 8。2 种抗原表位皆分布于 VP22 蛋白表面。

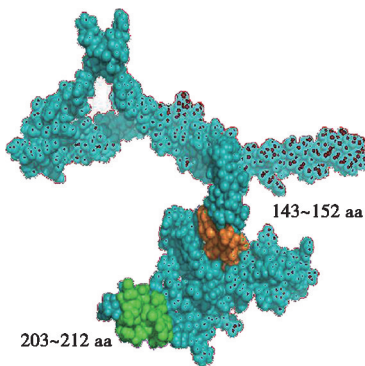


图8 PRV VP22 蛋白空间结构建模

2.11 VP22 蛋白抗原表位氨基酸位点比对分析

不同 PRV 毒株 VP22 蛋白的氨基酸序列经 BioEdit 软件比对后, 结果如图 9 所示, 所鉴定出 2 种抗原表位¹⁴³ LDVGRRLAF¹⁵² 和²⁰³ DAALDRFLQA²¹² 在多种 PRV 毒株中完全保守, 氨基酸序列无差异。

3 讨论

猪伪狂犬病作为急性、烈性、高度接触性传染病, 是严重危害我国养猪业发展的重大疫病之一^[10-11]。2011 年以来我国出现的 PRV 流行毒株发生抗原变异^[12], 且毒力明显增强, 而某些 Bartha-K61 弱毒苗可对经典野毒株提供有效的免疫防护, 但针对一些新型变异毒株便无法产生全面的保护^[13], 给我国针对伪狂犬病的防控工作带来新的挑战, 所以进一步了解 PRV 变异毒株毒力的分子机制十分重要, 迫切需要新的策略来控制 PRV 传播。

PRV VP22 蛋白是由 UL49 基因编码的一种被膜蛋白^[14], 在 α 疱疹病毒中十分保守, 对病毒毒力有重要影响。作为病毒粒子被膜的主要组成部分^[15], VP22 蛋白在病毒感染各个阶段通过与病毒和细胞蛋白的相互作用来执行多种功能, 如影响病毒蛋白合成、参与病毒粒子的组装、逃避先天免疫反应以促进病毒生命周期等。当前, 已有研究表明, VP22 不仅在单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 感染早期能增强 gE 和 gD mRNA 的积累, 还可在感染后期促进蛋白质的合成, 如糖蛋白 gD、gB^[16]。同时 VP22 已被证明可与许多蛋白质相互作用, 如病毒糖蛋白 gE、gM 和立即早期基因表达的病毒反式激活因子 VP16^[17], 这些

相互作用与成熟病毒颗粒的形成有关，尤其是 VP22 蛋白可能在病毒体二次包膜过程中发挥作用^[18]，因而未来的研究将确定 VP22 蛋白如何发挥作用以促进病毒传播^[19]。据报道，感染 HSV-1 后 VP22 蛋白可直接结合并抑制环状 GMP-AMP 合成酶（cGAS）活性，导致干扰素 β（IFN-β）产生下调，从而抑制 cGAS/STING 介导的天然抗病毒免疫途径^[20]。此外，还发现 VP22 可以与黑素瘤缺乏因子 2（AIM2）相互作用并阻止其寡聚化，从而抑制 AIM2 依赖性炎症小体的激活，逃避宿主免疫反应以实现体内有效的病毒复制^[21]。VP22 蛋白不仅在 HSV-1、PRV 中具有重要作用，在其他疱疹病毒中同样发挥重大功能。ORF9p 是水痘-带状疱疹病毒（VZV）中 VP22 的同

源蛋白，对病毒复制至关重要^[22]，在病毒核出芽和二次包膜中具有重要作用^[23]。研究发现，在 γ 疱疹病毒卡波齐肉瘤相关疱疹病毒（KSHV）中，VP22 的同源蛋白 ORF52 可抑制 cGAS 酶活性^[24]，并能够有效限制体外和细胞中 cGAS-DNA 的相分离^[25]。而蛋白 pp65 作为 VP22 在人巨细胞病毒（HCMV）中的同系物，可能在逃避宿主先天免疫反应中发挥作用如影响 NF-κB 和干扰素调节因子的抗病毒作用^[26]。总而言之，VP22 蛋白在病毒生命周期中具有至关重要的作用，对其功能和机制的进一步研究将为宿主细胞中疱疹病毒的生命周期以及病原体同宿主细胞分子间的相互作用提供重要的参考数据。

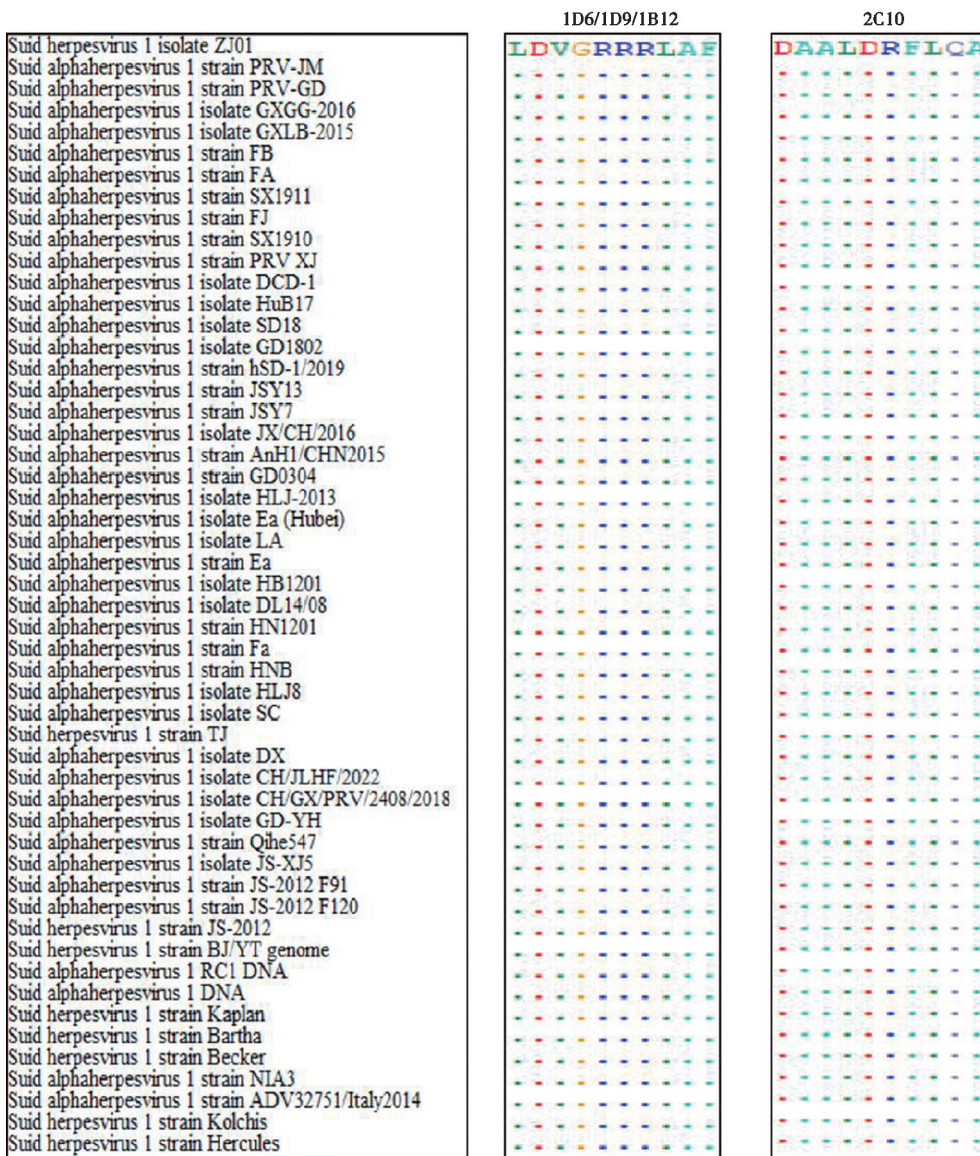


图 9 PRV VP22 蛋白抗原表位保守性分析

综上，本研究通过原核表达系统成功制备重组 VP22 蛋白，并用其免疫 BALB/c 小鼠，后采用常规

的细胞融合和间接 ELISA 筛选方法制备出 4 株单克隆抗体。4 株单克隆抗体皆能与 PRV 发生特异性反

应,是可靠的病毒分子生物学研究工具。利用 VP22 单克隆抗体鉴定出 VP22 蛋白为病毒早期蛋白,并且在病毒感染早期定位于细胞质中,感染后期迁移到细胞核内。同时,本研究鉴定出 PRV ZJ01 毒株 VP22 蛋白 2 个 B 细胞线性表位,分别位于 143~152 aa 和 203~212 aa,为研究 PRV VP22 蛋白结构与功能提供了重要材料。

参考文献:

- [1] FREULING C M, HLINAK A, SCHULZE C, et al. Suid alphaherpesvirus 1 of wild boar origin as a recent source of Aujeszky's disease in carnivores in Germany [J]. *Virology*, 2023, 20 (1): 110.
- [2] PACINI M I, FORZAN M, CILIA G, et al. Detection of pseudorabies virus in wild boar foetus [J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10 (2): 366.
- [3] MÜLLER T, HAHN E C, TOTTEWITZ F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective [J]. *Arch Virology*, 2011, 156 (10): 1691-1705.
- [4] ZHENG H H, FU P F, CHEN H Y, et al. Pseudorabies virus: from pathogenesis to prevention strategies [J]. *Viruses*, 2022, 14 (8): 1638.
- [5] VERIN R, VARUZZA P, MAZZEI M, et al. Serologic, molecular, and pathologic survey of pseudorabies virus infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Italy [J]. *J Wildl Dis*, 2014, 50 (3): 559-565.
- [6] BO Z, LI X. A Review of pseudorabies virus variants: genomics, vaccination, transmission, and zoonotic potential [J]. *Viruses*, 2022, 14 (5): 1003.
- [7] WU L, CHENG A, WANG M, et al. Alphaherpesvirus major tegument protein VP22: its precise function in the viral life cycle [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1908.
- [8] 赵明明, 翟晓凤, 粟硕. 猪血凝性脑脊髓炎病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及表位鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (3): 119-124.
- [9] 张路捷, 高雁妮, 夏婷婷, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (6): 111-115.
- [10] 彭鑫. 猪伪狂犬病的诊断与防治 [J]. *中国畜禽种业*, 2021, 17 (10): 145-146.
- [11] 李紫彤, 赵晨遥, 朱慧欣, 等. 米非司酮的抗伪狂犬病毒作用及其与氢醌的协同效应 [J]. *南京农业大学学报*, 2023, 46 (2): 316-323.
- [12] JIANG C, MA Z, BAI J, et al. Comparison of the protective efficacy between the candidate vaccine ZJ01R carrying gE/gI/TK deletion and three commercial vaccines against an emerging pseudorabies virus variant [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 276: 109623.
- [13] PAPAGEORGIOU K V, MICHAILEDIOU M, GRIVAS I, et al. Bartha-K61 vaccine protects nursery pigs against challenge with novel european and asian strains of suid herpesvirus 1 [J]. *Vet Res*, 2022, 53 (1): 47.
- [14] POMERANZ L E, BLAHO J A. Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection [J]. *J Virol*, 1999, 73 (8): 6769-6781.
- [15] ARII J, GOTO H, SUENAGA T, et al. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1 [J]. *Nature*, 2010, 467 (7317): 859-862.
- [16] DUFFY C, MBONG E F, BAINES J D. VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection [J]. *J Virol*, 2009, 83 (2): 1009-1017.
- [17] SCIORTINO M T, TADDEO B, GIUFFRÈ-CUCULLETTO M, et al. Replication-competent herpes simplex virus 1 isolates selected from cells transfected with a bacterial artificial chromosome DNA lacking only the UL49 gene vary with respect to the defect in the UL41 gene encoding host shutoff RNase [J]. *J Virol*, 2007, 81 (20): 10924-10932.
- [18] DUFFY C, LAVAIL J H, TAUSCHER A N, et al. Characterization of a UL49-null mutant: VP22 of herpes simplex virus type 1 facilitates viral spread in cultured cells and the mouse cornea [J]. *J Virol*, 2006, 80 (17): 8664-8675.
- [19] FUCHS W, KLUPP B G, GRANZOW H, et al. Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49 [J]. *J Virol*, 2002, 76 (16): 8208-8217.
- [20] HUANG J, YOU H, SU C, et al. Herpes simplex virus 1 tegument protein VP22 abrogates cGAS/STING-mediated antiviral innate immunity [J]. *J Virol*, 2018, 92 (15): e00841-18.
- [21] MARUZURU Y, ICHINOHE T, SATO R, et al. Herpes simplex virus 1 VP22 inhibits AIM2-dependent inflammasome activation to enable efficient viral replication [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23 (2): 254-265.
- [22] LEBRUN M, LAMBERT J, RIVA L, et al. Varicella-zoster virus ORF9p binding to cellular adaptor protein complex 1 is important for viral infectivity [J]. *J Virol*, 2018, 92 (15): e00295-18.
- [23] HERTZOG J, ZHOU W, FOWLER G, et al. Varicella-zoster virus ORF9 is an antagonist of the DNA sensor cGAS [J]. *EMBO J*, 2022, 41 (14): e109217.
- [24] BHOWMIK D, DU M, TIAN Y, et al. Cooperative DNA binding mediated by KicGAS/ORF52 oligomerization allows inhibition of DNA-induced phase separation and activation of cGAS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (16): 9389-9403.
- [25] WU J J, LI W, SHAO Y, et al. Inhibition of cGAS dna sensing by a herpesvirus virion protein [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18 (3): 333-344.
- [26] ZHENG B, LI M, GAO S, et al. Characterization of a novel group of antisense transcripts in human cytomegalovirus UL83 gene region [J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (12): 2033-2041.