

刘亚林, 梁真洁, 杨兴森, 等. 鸭坦布苏病毒 prM 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 98-106.

LIU Y L, LIANG Z J, YANG X M, et al. Preparation of monoclonal antibodies against the prM protein of duck Tembusu virus and identification of B cell epitopes [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 98-106.

## 鸭坦布苏病毒 prM 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定

刘亚林, 梁真洁, 杨兴森, 曹瑞兵\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为制备鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 膜前体蛋白 (prM) 的单克隆抗体, 将原核表达的重组 prM 蛋白配伍佐剂免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 3 次免疫后分离小鼠脾细胞并将其与 SP2/0 细胞进行融合, 通过间接 ELISA 筛选, 获得 2 株能稳定分泌抗 DTMUV prM 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 3H4 和 5C10。2 株杂交瘤细胞均能稳定分泌抗体, 制备的腹水抗体效价分别为 1:51 200 和 1:102 400。亚型鉴定结果显示, 3H4 和 5C10 单克隆抗体的重链均属于 IgG2b, 轻链均为 Kappa 型。Western blot 和间接免疫荧光试验结果显示, 这 2 株单克隆抗体均能与 BHK-21 细胞中感染的 DTMUV 发生特异性反应, 而与同属的日本脑炎病毒无交叉反应。微量病毒空斑减少中和试验结果表明, 这 2 株单克隆抗体均具有中和活性。进一步原核表达 prM 蛋白不同截短体, 发现 2 株单抗针对不同表位, 均位于 prM 蛋白的 pr 片段上。本研究制备的单克隆抗体 3H4 和 5C10 为快速检测 DTMUV 感染和研究 prM 蛋白的结构与功能奠定了基础。

**关键词:** 鸭坦布苏病毒; prM 蛋白; 原核表达; 单克隆抗体; B 细胞表位

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)01-0098-09

## Preparation of monoclonal antibodies against the prM protein of duck Tembusu virus and identification of B cell epitopes

LIU Yalin, LIANG Zhenjie, YANG Xingmiao, CAO Ruibing\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** This study was to prepare monoclonal antibodies against the prM protein of the duck Tembusu virus (DTMUV). A group of 6-week-old female BALB/c mice were immunized with recombinant prM proteins mixed with adjuvant. After booster immunization, the spleen cells of the serum positive mice were obtained and fused with SP2/0 cells. By indirect ELISA screening, two hybridoma cell lines that steadily secreted monoclonal antibodies against DTMUV prM proteins were obtained, and were named 3H4 and 5C10. The two hybridoma cells were able to consistently secrete specific antibodies, and the valence of the antibodies in the prepared ascites was 1:51 200 and 1:102 400. The results of the antibody subtype identification showed that the heavy chains of the 3H4 and 5C10 monoclonal antibodies belonged to IgG2b, and the light chains were of the Kappa type. The Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) results showed that both strains of the monoclonal antibodies reacted specifically with the DTMUV-infected BHK-21 cells without cross-reactivity with JEV. The results of the virus plaque reduction neutralization test in microplates showed that both the monoclonal antibodies had virus neutralizing ability. The truncated expression of the prM fragment was performed, and the two monoclonal antibodies were shown to target different epitopes, both located in the pr protein. The monoclonal antibodies 3H4 and 5C10 prepared in this study laid a foundation for rapid detection of duck Tembusu virus infection and for structural and functional studies of prM protein.

**Keywords:** duck Tembusu virus; prM protein; prokaryotic expression; monoclonal antibody; B cell epitopes

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒 (duck Tembusu virus, DTMUV) 引起的一种以商品蛋鸭、肉种鸭采食量、产蛋量骤然大幅下降为主要临床特征, 以

出血性卵巢炎为主要病变特征的急性传染病。DTMUV 可感染不同日龄鸭, 患病鸭还会出现严重的神经症状, 如共济失调、瘫痪等<sup>[1-2]</sup>。2010 年我国首次暴发鸭坦布苏病毒病, 其感染率可高达 100%, 死亡率可达 10%~30%。该病可危害鸭、番鸭、鹅、蛋鸡、鸽、麻雀等多种禽类, 给我国禽类养殖业带来严重危害<sup>[3-4]</sup>。DTMUV 属于黄病毒科、黄病毒属、恩塔亚病毒群。病毒粒子呈球形, 病毒基因组为单股正链 RNA, 一个 ORF 编码的前体蛋白经病毒和宿主蛋

收稿日期: 2023-03-03; 修回日期: 2023-11-08

基金项目: 江苏现代农业 (水禽) 产业技术体系疾病防控创新团队项目 (JATS [2022] 360)

第一作者: 刘亚林, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 曹瑞兵, 教授, 主要从事动物传染病诊断与免疫方面的研究, E-mail: crb@njau.edu.cn.

白酶水解后形成3个结构蛋白及7个非结构蛋白,即核衣壳蛋白(C)、膜前体蛋白(prM)和囊膜蛋白(E)及NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5<sup>[5]</sup>。其中prM蛋白含167个氨基酸,主要存在于感染细胞内未成熟的病毒粒子中,可被细胞中的弗林蛋白酶切割成pr片段(92 aa)和M蛋白(75 aa),病毒在宿主细胞内的装备过程中,prM参与病毒囊膜的组成,对病毒复制及维持空间结构起重要作用<sup>[6]</sup>。

目前针对鸭坦布苏病毒prM蛋白结构和功能的研究较少。本试验首先利用DNASTAR系统分析发现,DTMUV XZ2012株prM蛋白前153个氨基酸抗原性及疏水性较好,故将该基因片段克隆到表达载体,在大肠杆菌中进行诱导表达并鉴定,然后以纯化后的重组prM蛋白做免疫原免疫BALB/c小鼠,应用杂交瘤细胞融合技术,成功筛选获得了2株稳定分泌抗DTMUV-prM的单克隆抗体,确定了单抗识别的抗原表位区域,为今后研究鸭坦布苏病毒prM蛋白结构、功能及病毒的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

鸭坦布苏病毒XZ2012株由本实验室分离、鉴定和保存。pET-28a(+)质粒、pET-32a(+)质粒、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞、大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞、BHK-21细胞及SP2/0小鼠骨髓瘤细胞均由本实验室保存。SPF级雌性BALB/c小鼠和ICR雌性小鼠(5~6周龄)购自扬州大学实验动物中心。

高保真酶2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix购自宝日生物技术(北京)有限公司;180 kDa Prestained Protein Marker购自诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性核酸内切酶BamH I、Xho I和T4 DNA连接酶购自Thermo Fisher Scientific公司;BCA蛋白质定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;羊抗鼠IgG(H+L)-HRP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、小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自Proteintech生物科技有限公司;Tanon<sup>TM</sup> High-sig ECL Western blot底物试剂盒购自天能科技有限公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、细胞融合剂PEG、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HAT和HT购自美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 重组质粒构建

参考GenBank数据库中DTMUV XZ2012(GenBank: KM188953.1)毒株的prM基因序列设计引物,prM-F: 5'-GCGGATCCATGCTGAAGCTTGGAA-

ATTATAA-3',含有BamH I酶切位点(下划线处);prM-R: 5'-TGCTCGAGTATCTTTTGGCTTCTCGTCG-3',含有Xho I酶切位点(下划线处),引物由北京擎科生物科技有限公司合成,用于扩增prM基因,目的基因大小为459 bp。以提取的DTMUV XZ2012株基因组RNA为模板,反转录合成cDNA,以cDNA为模板PCR扩增prM基因。PCR反应条件:98 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,62 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。将目的片段和pET-28a(+)载体经BamH I和Xho I双酶切回收,然后用T4 DNA连接酶进行连接。将连接产物转化至DH5 $\alpha$ 感受态中,细菌经抗性单克隆培养、PCR和双酶切鉴定,正确后送通用生物系统公司测序,将测序正确的质粒命名为pET28a-prM,置-20 $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.3 prM蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒pET28a-prM转化至BL21感受态中,置于含卡那霉素的LB液体培养基中培养至菌液OD<sub>600 nm</sub>为0.4~0.6,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,于37 $^{\circ}$ C、200 r/min摇床诱导表达4 h。将诱导后菌体进行超声波破碎,于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,分别收集上清液和沉淀,通过SDS-PAGE鉴定目的蛋白表达形式。用His镍柱纯化目的蛋白,利用BCA法测定目的蛋白浓度,重组prM蛋白分装后置-80 $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.4 重组蛋白prM单克隆抗体制备

#### 1.4.1 动物免疫

取5只5~6周龄雌性BALB/c小鼠,将纯化的重组prM蛋白与弗氏完全佐剂1:1混匀乳化,通过皮下多点注射方式免疫小鼠,60 $\mu$ g/只。二免、三免用弗氏不完全佐剂乳化,每次免疫间隔2周,第3次免疫后1周对小鼠进行尾静脉采血,分离血清,用间接ELISA方法测定血清抗体效价。融合前3 d选取抗体效价最高的小鼠进行加强免疫,腹腔注射重组蛋白,60 $\mu$ g/只。

#### 1.4.2 单克隆抗体制备

加强免疫后3 d,将小鼠安乐死并分离脾细胞,在PEG4000作用下与对数生长期的SP2/0细胞按照7:1的比例进行细胞融合。将融合细胞铺至含有HAT选择培养基的96孔细胞板中培养。细胞融合7 d后观察96孔板中细胞融合情况,取有杂交瘤细胞生长的细胞培养上清液100 $\mu$ L,用间接ELISA进行检测。阳性杂交瘤细胞需进行2~3次亚克隆。将稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株扩大培养、冻存于液氮中长期保存。

#### 1.4.3 间接ELISA检测抗体

将重组prM蛋白用碳酸盐抗原包被液稀释至

2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被酶标板, 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 用 5% 脱脂乳于 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。将杂交瘤细胞培养上清液加入酶标板, 同时将小鼠血清按 1 : 1 000 稀释设立阴、阳性对照, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 加入 100  $\mu\text{L}$  羊抗鼠 IgG (H+L) - HRP (1 : 6 000 稀释) 于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 10 min; 加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。为了排除载体自身诱导表达的蛋白影响检测结果, 试验采用 pET28a-*vp70* 重组质粒诱导表达的蛋白作为抗原包被酶标板, 用制备的抗体孵育进行反检。用酶标仪测定每孔  $OD_{450\text{nm}}$  值, 待检样品  $OD_{450\text{nm}}/\text{阴性样品 } OD_{450\text{nm}}$  ( $P/N$ ) > 2.1 判定为阳性, 其阳性孔对应的抗体最大稀释倍数即为该抗体的效价。

#### 1.4.4 小鼠单抗腹水的制备

选取 7 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 先向小鼠腹腔内注射 500  $\mu\text{L}$  无菌液体石蜡。7 d 后, 向小鼠腹腔注射  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个杂交瘤细胞。5~7 d 后, 观察小鼠腹部变大、触之有波动感、行动不敏捷、被毛粗糙时收集腹水, 4 000 r/min 离心 5 min, 取中间层, 置 -80  $^{\circ}\text{C}$  长期保存备用。

### 1.5 单克隆抗体生物学特性鉴定

#### 1.5.1 单克隆抗体分泌稳定性及亚型测定

将阳性杂交瘤细胞连续传代培养 20 代, 每隔 5 代冻存一批细胞, 利用 ELISA 测定不同代次细胞上清液的抗体效价。使用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒按照说明书方法鉴定单克隆抗体亚型。

#### 1.5.2 Western blot 鉴定单抗

分别取 DTMUV 感染 BHK-21 细胞和 JEV 感染 BHK-21 细胞样品, 先进行 SDS-PAGE, 然后转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF 膜) 上。5% 脱脂奶粉封闭, 以杂交瘤细胞上清液作为一抗, 进行 Western blot。以 BHK-21 细胞作为阴性对照, 鉴定 prM 单克隆抗体反应的特异性。

#### 1.5.3 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定单抗

用 DTMUV 感染 BHK-21 细胞, 以未感染 DTMUV 的细胞作为对照, 培养 36 h 后用 4% 多聚甲醛固定, 用 PBS (pH = 7.2) 洗涤 3 次, 用 0.1% 的 Triton 100 作用 15 min; 洗涤后每孔加入含有 2% 牛血清白蛋白 (BSA) PBS 200  $\mu\text{L}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h; 洗涤后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  杂交瘤细胞培养上清液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 洗涤后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  FITC-羊抗鼠 IgG (用 PBS 进行 1 : 200 稀释), 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h, 用 PBS 重复洗涤 3 次, 将细胞板置于荧光显微镜下观察, 使用 EVOS FL 细胞成像系统拍摄照片并保存。

#### 1.5.4 微量病毒空斑减少中和试验

将 BHK-21 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞长至细胞孔 80% 左右时, 将单克隆抗体细胞上清液在 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴灭活处理 30 min, 用 DMEM 培养液按 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 进行倍比稀释, 然后将稀释成 200  $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  的病毒液与等量倍比稀释的单克隆抗体细胞上清液均匀混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 接种 BHK-21 细胞, 72 h 后观察空斑形成情况。

### 1.6 单抗识别 B 细胞抗原表位的鉴定

利用 IEDB ([http://www.iedb.org/home\\_v3.php](http://www.iedb.org/home_v3.php)) 分析 prM 蛋白序列抗原特性, 预测单克隆抗体的 B 细胞表位, 然后将 prM 蛋白进行逐步截短并克隆至 pET-32a (+) 载体中。以制备的单克隆抗体 3H4 和 5C10 为一抗, 通过 Western blot 鉴定 prM 单克隆抗体所识别的抗原表位区域。

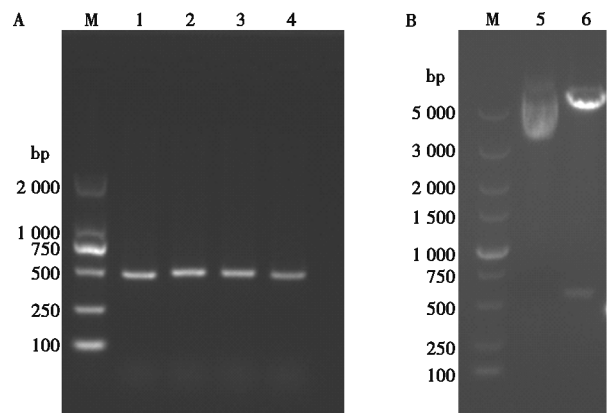
#### 1.7 抗原表位氨基酸位点比对分析

选择不同来源的 DTMUV 16 个代表毒株的 prM 基因序列以及同属黄病毒中的日本脑炎病毒 (JEV)、登革热病毒 (DENV) 和西尼罗病毒 (WNV) 的 prM 基因序列, 利用 BioEdit 软件比对 prM 蛋白氨基酸序列, 分析 B 细胞抗原表位序列在各毒株中的保守性。

## 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 PCR 扩增的 prM 目的基因片段大小为 459 bp, 与理论值相符 (图 1)。将构建的重组质粒 pET28a-prM 进行双酶切鉴定, 酶切后的基因片段与目的基因大小一致, 基因测序结果正确, 无任何突变。



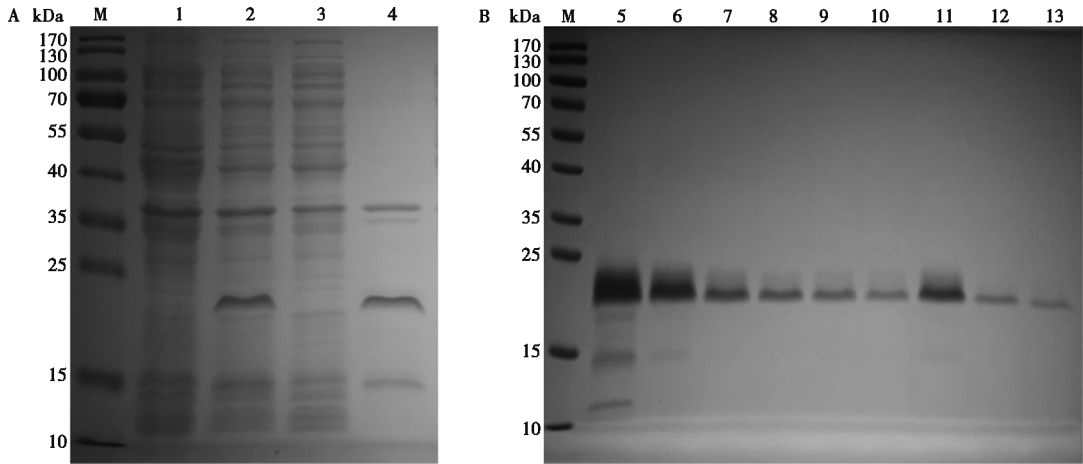
M. DNA Marker; 1~4. prM 基因 PCR 产物; 5. pET28a-prM 重组质粒; 6. pET28a-prM 双酶切产物。

图 1 DTMUV prM 基因 PCR 扩增 (A) 及重组质粒 pET28a-prM 酶切鉴定 (B)

## 2.2 重组 prM 蛋白表达与纯化

重组菌 BL21-prM 经 IPTG 诱导后成功表达，在 20 kDa 大小处有明显条带，SDS-PAGE 结果显示与预期大小相符，将诱导后的全菌超声裂解后发现重组

蛋白主要以包涵体形式表达（图 2A）。通过使用镍柱亲和层析纯化，利用不同浓度咪唑洗脱得到单一条带的重组 prM 蛋白（图 2B）。



M. 蛋白分子量标准；1. 空载体诱导全菌蛋白；2. 重组质粒诱导表达全菌蛋白；3. 重组质粒诱导表达后上清液；4. 重组质粒诱导表达后沉淀；5~13. 纯化的重组 prM 蛋白（5 为过柱前重组 prM 蛋白，6~10 为 200 mmol/L 咪唑洗脱得到重组 prM 蛋白，7~13 为 300 mmol/L 咪唑洗脱得到重组 prM 蛋白）。

图 2 重组 prM 蛋白表达鉴定 (A) 和纯化蛋白 (B) SDS-PAGE 分析

## 2.3 小鼠血清抗体效价测定

小鼠第 3 次免疫后 10 d，通过尾静脉采血，利用间接 ELISA 检测小鼠血清抗体效价（图 3）。与阴性小鼠相比，免疫组的所有小鼠均表现出较高水平的 prM 蛋白抗体效价，血清抗体效价均大于 1 : 25 600。选取抗体效价最高的 1 号小鼠，取脾细胞与 SP2/0 细胞融合制备杂交瘤细胞。

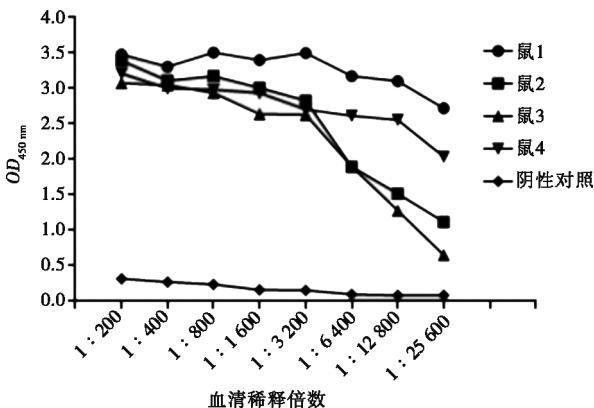


图 3 间接 ELISA 检测小鼠血清效价

## 2.4 DTMUV prM 单克隆抗体制备及效价测定

采用间接 ELISA 筛选出 2 株能稳定分泌抗 DTMUV prM 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，分别命名为 3H4 和 5C10。将 2 株阳性杂交瘤细胞进行连续传代至 20 代，用 ELISA 检测细胞上清液抗体效价稳定（表 1），同时用 2 株阳性杂交瘤细胞制备小鼠腹水，其中 5C10 抗体效价为 1 : 102 400，3H4 抗体效价为 1 : 51 200。

表 1 杂交瘤细胞上清液和腹水 ELISA 抗体效价测定

单克隆抗体	细胞培养上清液抗体效价			腹水效价
	P5	P10	P20	
3H4	1 : 3 200	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 51 200
5C10	1 : 12 800	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 102 400

## 2.5 DTMUV prM 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体亚型鉴定结果表明：3H4 和 5C10 单克隆抗体的重链均属于 IgG2b 亚类，轻链均为 Kappa 型（表 2）。

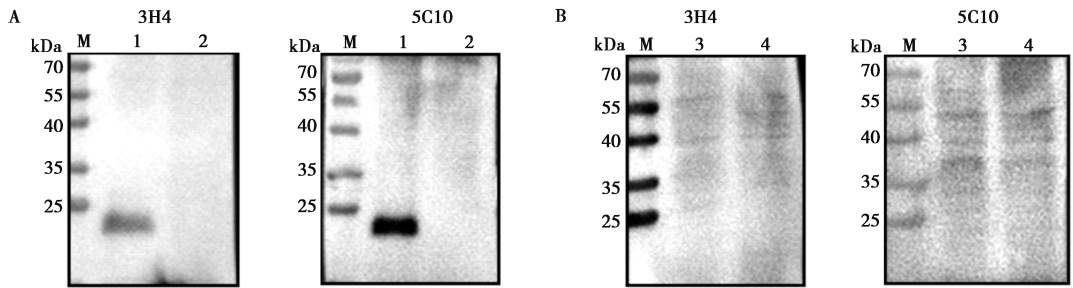
表 2 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体	亚类						轻链亚型	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa	Lambda
3H4	0.334	0.397	1.901	0.227	0.190	0.309	1.571	0.374
5C10	0.276	0.384	1.831	0.383	0.203	0.251	1.479	0.356

### 2.6 DTMUV prM 单克隆抗体 Western blot 反应性鉴定

Western blot 鉴定结果显示, 2 株单克隆抗体 3H4 和 5C10 均能特异性识别 DTMUV 接种 BHK-21 细胞中大小约为 20 kDa 的病毒蛋白, 与 prM 蛋白大小一

致 (图 4A), 而这 2 株单克隆抗体均不与 JEV 接种的 BHK-21 发生特异性反应 (图 4B), 表明所制备的这 2 株单克隆抗体均能特异性识别 DTMUV prM 蛋白, 而与 JEV 没有交叉反应。



M. 蛋白分子量标准; 1. DTMUV 感染的 BHK-21 细胞样品; 2、4. 正常细胞对照; 3. JEV 感染的 BHK-21 细胞样品。

图 4 抗 DTMUV prM 蛋白单克隆抗体与 DTMUV (A) 和 JEV (B) Western blot 反应特性鉴定

### 2.7 DTMUV prM 单克隆抗体 IFA 反应特性鉴定

IFA 结果显示: 单克隆抗体 3H4 和 5C10 均能与 DTMUV 感染的 BHK-21 细胞发生反应, 产生特异性的绿色荧光, 阳性细胞中抗体荧光分布在细胞质, 与

DTMUV prM 在细胞中的表达和分布一致, 而经单克隆抗体处理的对照组 BHK-21 细胞均未见特异性荧光 (图 5)。表明这 2 株单克隆抗体均能特异性结合 DTMUV, 具有良好的反应原性和特异性。

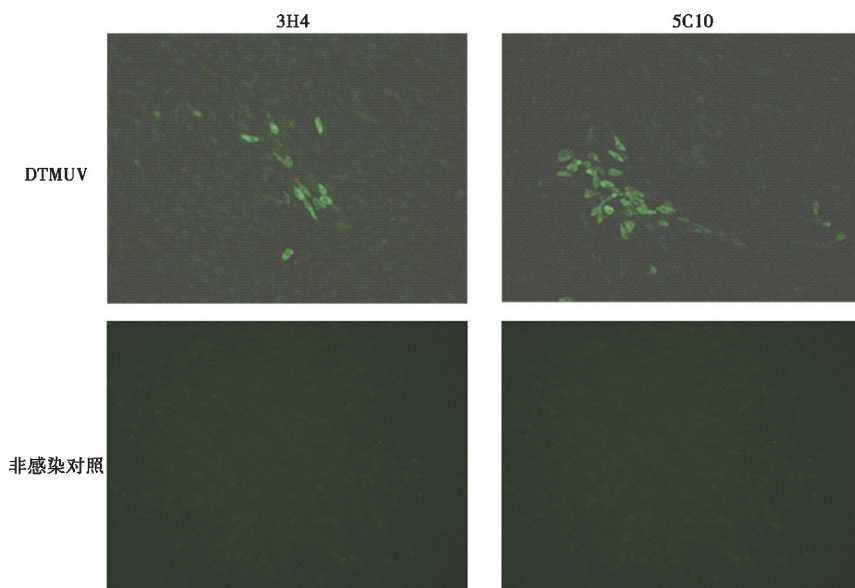
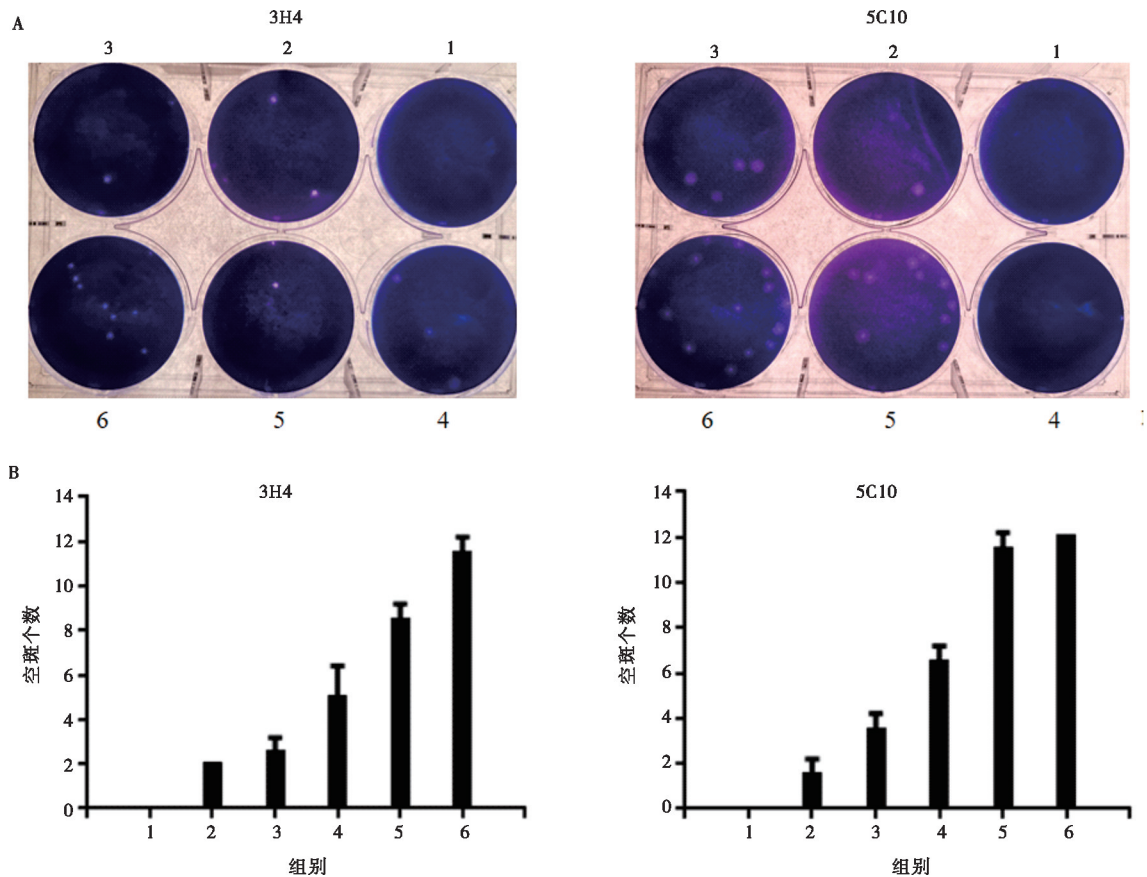


图 5 抗 prM 蛋白单克隆抗体与 DTMUV 的 IFA 反应特性鉴定 (200×)

## 2.8 DTMUV prM 单克隆抗体病毒中和活性测定

通过空斑减少试验测定单克隆抗体 3H4 和 5C10 的中和活性 (图 6), 在等量病毒液中加入不同稀释度的抗体作用后, 细胞孔中病毒感染空斑个数出现变

化, 意味着病毒的数量发生了变化。通过 Reed-Muench 法计算单克隆抗体的中和效价, 3H4 和 5C10 的中和效价分别为 1:34 和 1:11.5, 这表明单克隆抗体 3H4 和 5C10 具有一定的中和活性。



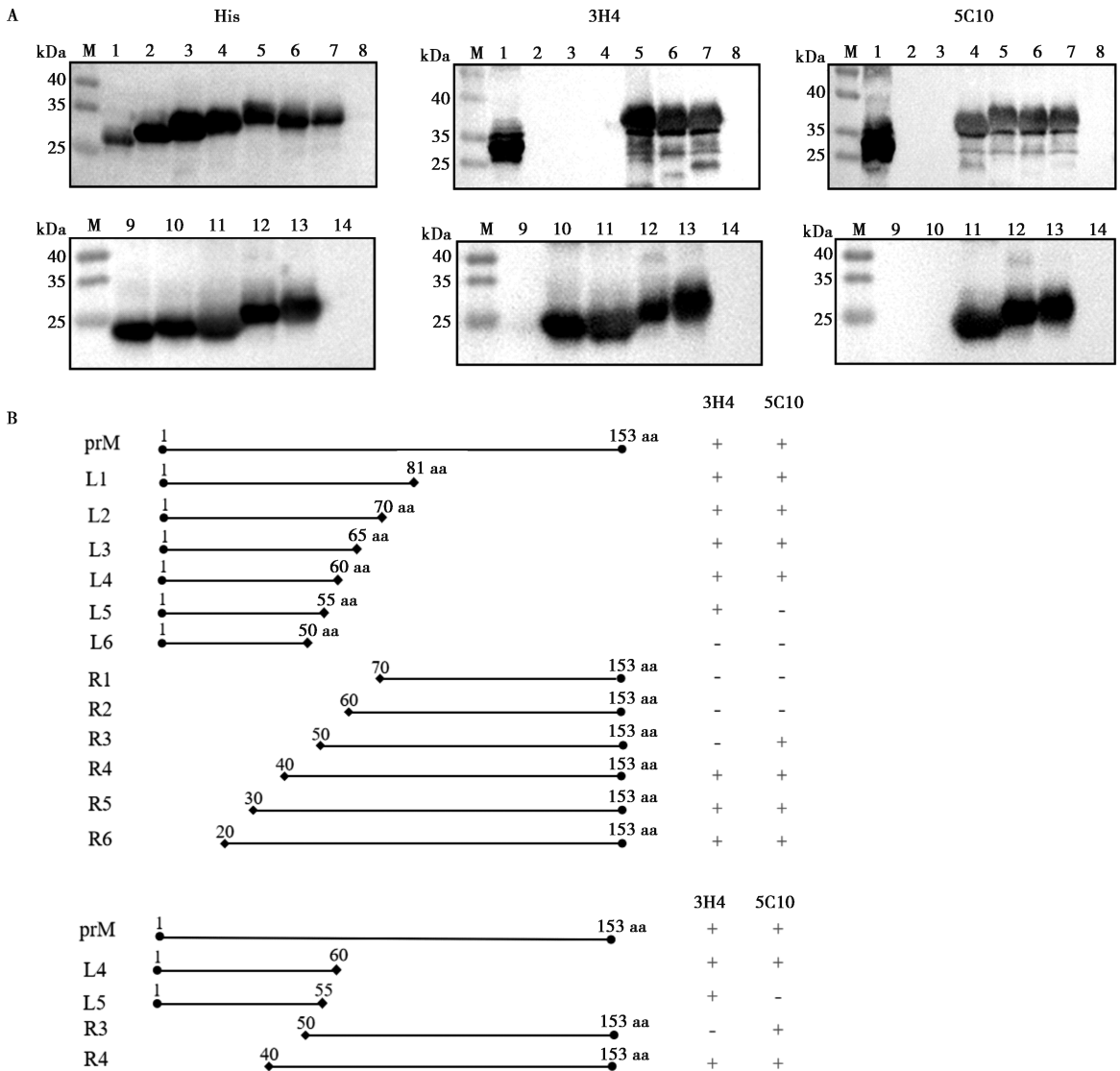
1~5. 单抗细胞上清液稀释比例分别为 1:1、1:10、1:20、1:40、1:80 稀释; 6. DMEM对照。

图 6 单克隆抗体 3H4 和 5C10 中和 DTMUV 活性试验 (A) 和统计分析 (B)

## 2.9 prM 蛋白截短体的表达及 B 细胞抗原表位的鉴定

为了探究单克隆抗体 3H4 和 5C10 识别的抗原表位区域, 首先将 prM 片段截断分成 2 个片段 prM<sub>1-81 aa</sub> 和 prM<sub>70-153 aa</sub>, 成功诱导表达后通过 3H4 和 5C10 单克隆抗体 Western blot 反应性鉴定, 发现 2 株单克隆抗体均与前段 prM<sub>1-81 aa</sub> 反应。为了进一步分析单克隆抗体 3H4 和 5C10 识别的抗原表位, 先在后段 prM<sub>70-153 aa</sub> 的基础上逐步向前加 10 个氨基酸构建出 5 个截短体 prM<sub>60-153 aa</sub>、prM<sub>50-153 aa</sub>、prM<sub>40-153 aa</sub>、prM<sub>30-153 aa</sub> 和 prM<sub>20-153 aa</sub>, 将以上截短体诱导表达后通过 3H4 和 5C10 单克隆抗体 Western blot 反应性鉴定, 同时设立空载诱导菌体作为阴性对照。Western blot 反应性鉴定结果显示 (图 7A), mAb 3H4 与重组蛋白 prM<sub>40-153 aa</sub>、prM<sub>30-153 aa</sub> 和 prM<sub>20-153 aa</sub> 有效结合, 但不能与 prM<sub>50-153 aa</sub> 和 prM<sub>60-153 aa</sub> 蛋白结合, 而 mAb 5C10 与

重组蛋白 prM<sub>50-153 aa</sub>、prM<sub>40-153 aa</sub>、prM<sub>30-153 aa</sub> 和 prM<sub>20-153 aa</sub> 有效结合, 但不能与 prM<sub>60-153 aa</sub> 蛋白结合。为进一步确定表位所在区域, 通过将前段基因序列进行逐步截短, 构建出截短体 prM<sub>1-50 aa</sub>、prM<sub>1-55 aa</sub>、prM<sub>1-60 aa</sub>、prM<sub>1-65 aa</sub> 和 prM<sub>1-70 aa</sub>, Western blot 反应性鉴定结果显示 (图 7B), mAb 3H4 可以和重组蛋白 prM<sub>1-55 aa</sub>、prM<sub>1-60 aa</sub>、prM<sub>1-65 aa</sub>、prM<sub>1-70 aa</sub> 反应, 而与重组蛋白 prM<sub>1-50 aa</sub> 不反应; mAb 5C10 可以和 prM<sub>1-60 aa</sub>、prM<sub>1-65 aa</sub> 和 prM<sub>1-70 aa</sub> 反应, 而与重组蛋白 prM<sub>1-50 aa</sub> 和 prM<sub>1-55 aa</sub> 不反应。综上根据 2 次截短体的鉴定结果, 绘制抗原表位鉴定示意图 (图 7C) 及简化示意图 (图 7D), 可以证明 mAb 3H4 的抗原识别区域大概为第 40~55 位氨基酸, 即 40DVGLMCQDDITYLCPK55, mAb 5C10 的抗原识别区域大概为第 50~60 位氨基酸, 即 50TYLCPKLEYGY60。



注：A. 单抗与截短体蛋白 Western blot 结果，其中 M 为蛋白分子量标准，1 为 L1 截短体，2~6 分别为 R1~R6 截短体，9 为 L6 截短体，10 为 L5 截短体，11 为 L4 截短体，12 为 L3 截短体，13 为 L2 截短体，8、14 为 pET-32a；B. 单抗识别抗原表位鉴定示意及判定结果，+表示有反应，-表示不反应。

图 7 3H4、5C10 单克隆抗体抗原表位鉴定

### 2.10 DTMUV 等黄病毒 pr 蛋白抗原表位氨基酸位点比对分析

通过利用 BioEdit 软件比对 DTMUV 的不同毒株和黄病毒属中其他病毒如：JEV、DENV、WNV 的 pr 蛋白氨基酸序列，结果发现（图 8）：第 40~60 位氨基酸之间的这 2 个抗原表位区域，在 DTMUV 不同毒

株间无氨基酸差异，保守性较高；DTMUV 与 DENV 和 WNV 差异较大，推测 DTMUV 的 prM 蛋白单克隆抗体与其应该无交叉反应；DTMUV 与 JEV 存在 7 个氨基酸差异，推测这 7 个氨基酸是导致这 2 株 prM 蛋白单克隆抗体与 JEV 无交叉反应的关键氨基酸。

DTMUV XZ2012.pro (167 aa)	GCVVRLDVGLMCQDDITYLCPKLEYGYEPEDIDCWCNETEIIY
DTMUV AH-F10.pro (167 aa)	.....
DTMUV AHQY.pro (167 aa)	.....
DTMUV BYD-1.pro (167 aa)	.....
DTMUV FX2010.pro (167 aa)	.....
DTMUV Goose CHN2019AQ-19.pro	.....
DTMUV GX2015.pro (167 aa)	.....
DTMUV HB2016.pro (167 aa)	.....
DTMUV HD-2015.pro (167 aa)	.....
DTMUV HZ-2014.pro (167 aa)	.....
DTMUV JS-L12015.pro (167 aa)	.....
DTMUV JS-S12015.pro (167 aa)	.....
DTMUV MM1775.pro (167 aa)	.....
DTMUV H.pro (167 aa)	.....
DTMUV HD2-2013.pro (167 aa)	.....
DTMUV HN2015.pro (167 aa)	.....
JEV-NJ08-PrM.prot (167 aa)	R.W...I...Y..E.T...E...TM.ND...V...DNQ.V..
DENV3-2014-PrM .pro (166 aa)	M.TLI.M.L.E..D.TV..K...IAEV.....L.STW'
WNV-PrM.fa (167 bp)	RN.Y.VA...W.GSN.MRVVVVVAA.SNCGMSNRDGVSG-ATW'

图8 DTMUV等黄病毒prM蛋白氨基酸序列分析

### 3 讨论

本研究成功制备了2株针对DTMUV-prM的单克隆抗体3H4和5C10,小鼠腹水抗体效价分别为1:51 200和1:10 2400,3H4和5C10单克隆抗体的重链均属于IgG2b亚类,轻链均为Kappa型;Western blot反应性鉴定试验显示,2株单克隆抗体均能与DTMUV感染的BHK-21细胞发生特异性反应,而与JEV没有交叉反应性,均在20 kDa处出现prM蛋白大小的预期条带,这说明细胞内的病毒多数以未成熟病毒粒子的形式存在;IFA反应性鉴定试验显示,2株单克隆抗体均能够识别DTMUV感染的BHK-21细胞,同时通过空斑减少中和试验结果发现这2株单克隆抗体具有一定的中和活性,证明制备的这2株单抗具有重要应用价值;而且鉴定出这2株单抗针对prM的不同表位,均分别位于pr部分,其中mAb 3H4的抗原位点识别区域为第40~55位氨基酸,mAb 5C10的抗原位点识别区域为第50~60位氨基酸,这为后续建立检测方法和研究DTMUV的生物学功能奠定了基础。

目前,对DTMUV等一些重要黄病毒的E、NS1、NS5等蛋白进行了深入研究<sup>[7-11]</sup>,然而针对DTMUV prM蛋白功能的研究还非常有限,仅见Huang等<sup>[12]</sup>制备了3株针对prM蛋白的单克隆抗体,且没有进行中和试验和抗原表位的鉴定。本研究针对prM蛋白获得的3H4和5C10单克隆抗体能特异性识别DTMUV,与JEV无交叉反应。利用DNASTAR软件对DTMUV、JEV、WNV、DENV等黄病毒的prM第40~60位抗原表位区域进行氨基酸序列比对,发现不同DTMUV毒株之间在prM这一抗原表位区域无差异,保守性较高,而DTMUV与JEV有7个氨基酸的差异,说明JEV这7个氨基酸对抗体表位的识别起

着关键作用,与WNV和DENV差异较大。这些结果提示:针对DTMUV prM蛋白的单克隆抗体仅能特异性识别DTMUV,对于多种黄病毒共存地区,在黄病毒感染的血清学研究中具有潜在的应用价值,为后续建立ELISA检测方法提供了物质基础。

黄病毒的prM蛋白被弗林蛋白酶裂解是激活产生成熟的具有感染性病毒粒子的必要条件<sup>[13-15]</sup>,prM未裂解的病毒粒子进入细胞后会使得E蛋白不能顺利和内体膜融合,从而影响病毒基因组的释放,prM蛋白的裂解程度将影响病毒复制和毒力。在病毒成熟的过程中,prM蛋白会被切割为pr部分和M蛋白,pr部分对于E蛋白在内质网的再加工及E蛋白最后的组装均起着重要作用<sup>[16-17]</sup>;M蛋白参与病毒囊膜的构成,与插入脂双层E蛋白的完全疏水C端相互作用,在细胞内对E蛋白进行折叠、修饰和装配,可诱导具有轻度中和作用的抗体,与病毒核心组成具有感染性的病毒粒子。本研究发现3H4和5C10单克隆抗体能特异性识别DTMUV的pr部分,而且具有一定的病毒中和活性,因为黄病毒弗林蛋白酶介导的prM蛋白裂解通常是不完全的,可在细胞外检测到未成熟、部分成熟和成熟病毒颗粒混合物<sup>[18-19]</sup>,因此单克隆抗体可以和病毒粒子暴露出来的prM蛋白结合,起到一定的中和作用。本试验发现针对DTMUV prM蛋白的单克隆抗体具有中和活性,而prM蛋白诱导中和抗体产生的功能域,prM蛋白对病毒入侵、组装和释放的影响机制及prM蛋白与其宿主分子之间的相互作用均有待进一步的研究。

综上,本研究通过杂交瘤细胞融合技术获得2株单克隆抗体,为建立DTMUV检测方法和研究prM蛋白生物学功能提供了物质基础。

## 参考文献:

- [1] SU J, LI S, HU X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e18106.
- [2] 滕巧泐, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡 [J]. *中国动物传染病学报*, 2010, 18 (6): 1-4.
- [3] YAN P, ZHAO Y, ZHANG X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China [J]. *Virology*, 2011, 417 (1): 1-8.
- [4] 李泽君. 鸭坦布苏病毒病原的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. *中国家禽*, 2011, 33 (17): 34-35.
- [5] TANG Y, DIAO Y, GAO X, et al. Analysis of the complete genome of Tembusu virus, a flavivirus isolated from ducks in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59 (4): 336-343.
- [6] 颜丕熙. 鸭坦布苏病毒分离鉴定及其生物学特性的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [7] REY F A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (12): 6899-6901.
- [8] 夏宇航. 基于鸭坦布苏病毒非结构蛋白 NS1 胶体金免疫层析试纸条的研制 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- [9] 杨国平, 刁有祥, 赵丹丹, 等. 抗鸭坦布苏病毒 NS5 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2016, 44 (10): 1-6.
- [10] 凡玉芳. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白中和表位的鉴定和受体的筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [11] 张森, 吕炫, 张冲, 等. 鸭坦布苏病毒囊膜糖蛋白结构域 3 (ED3) 单克隆抗体的制备及其中和活性分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38 (10): 931-938.
- [12] HUANG X, SHI T, MO K, et al. Monoclonal antibody against pre-membrane viral protein of avian Tembusu virus [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2017, 36 (2): 57-61.
- [13] ELSHUBER S, ALLISON S L, HEINZ F X, et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84 (Pt 1): 183-191.
- [14] ZYBERT I A, VAN DER ENDE-METSELAAR H, WILSCHUT J, et al. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (Pt 12): 3047-3051.
- [15] RODENHUIS-ZYBERT I A, WILSCHUT J, SMIT J M. Partial maturation; an immune-evasion strategy of dengue virus? [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19 (5): 248-254.
- [16] KEELAPANG P, NITATPATTANA N, SUPHATRAKUL A, et al. Generation and preclinical evaluation of a DENV-1/2 prM+E chimeric live attenuated vaccine candidate with enhanced prM cleavage [J]. *Vaccine*, 2013, 31 (44): 5134-5140.
- [17] SOLOMON T, VAUGHN D W. Pathogenesis and clinical features of Japanese encephalitis and West Nile virus infections [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 267: 171-194.
- [18] XIONG J, YAN M, ZHU S, et al. Increased cleavage of Japanese encephalitis virus prM protein promotes viral replication but attenuates virulence [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (3): e141722.
- [19] LI L, LOK S M, YU I M, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex; structure and maturation [J]. *Science*, 2008, 319 (5871): 1830-1834.