

任语馨, 张杰, 高雁妮, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒谱系 8 毒株特异性单克隆抗体研制 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 111-118.

REN Y X, ZHANG J, GAO Y N, et al. Development of monoclonal antibodies specific to the lineage 8 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 111-118.

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒谱系 8 毒株特异性单克隆抗体研制

任语馨, 张杰, 高雁妮, 孙杨杨, 张路捷, 白娟, 姜平\*

(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:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 流行毒株存在多种基因亚型 (谱系) 和抗原性差异, 为了鉴别不同谱系流行毒株, 选取 PRRSV 谱系 8 毒株 BB0907 (高致病性毒株) 非结构蛋白 2 (NSP2) 高变区基因片段 (tNSP2), 采用大肠杆菌表达制备获得 NSP2 重组蛋白, 并免疫 BALB/c 小鼠。结果: 研制出 5 株 NSP2 单克隆抗体 (3D6、6B2、6C3、8C2 和 8H6), 小鼠腹水 ELISA 抗体效价均达 1:216 000; 5 株单抗轻链类型都为 Kappa 型, 3D6、6B2 和 6C8 的重链类型为 IgG1, 8C2 的重链类型为 IgG2b, 8H6 重链类型为 IgG2a; 通过构建 tNSP2 蛋白截短体, Western blot 鉴定出 4 个抗原表位, 即<sup>485</sup>GPLNFPTPSE<sup>494</sup>、<sup>555</sup>FPLAPSQNMG<sup>564</sup>、<sup>575</sup>EVLSEISDIL<sup>584</sup>和<sup>585</sup>NDTPAPVS<sup>593</sup>; 间接免疫荧光试验结果显示, 这些单抗均能与 PRRSV 谱系 8 毒株发生特异性反应, 但与谱系 1 和谱系 5 毒株不反应。本研究为 PRRSV 分离毒株抗原鉴别诊断和生物学研究提供了有意义的研究材料。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; Nsp2; 单克隆抗体; B 细胞表位

中图分类号: S858.28

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)01-0111-08

## Development of monoclonal antibodies specific to the lineage 8 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

REN Yuxin, ZHANG Jie, GAO Yanni, SUN Yangyang, ZHANG Lujie, BAI Juan, JIANG Ping\*

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

**Abstract:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), which is a pathogen that seriously endangers China's breeding industry, has multiple genotypes (lineages) and antigenic differences in circulating strains. In order to identify the circulating strains of different lineages, the NSP2 recombinant protein was prepared by using the NSP2 hypervariable region gene fragment (tNSP2) of the PRRSV lineage 8 epidemic strain BB0907 (a highly pathogenic strain), and the NSP2 recombinant protein obtained was used to immunize BALB/c mice. As a result, five monoclonal cell lines that could stably secrete antibodies were developed by cell fusion. The titers of the antibodies in ascites fluid in mice were  $\geq 1:216\ 000$ . The heavy chains of 3D6, 6B2 and 6C8 were IgG1, the heavy chain of 8C2 was IgG2, while the heavy chain of 8H6 was IgG2a, and the light chains of the five McAbs were of kappa subtype. Four epitopes were identified by the construction of NSP2 protein truncates, which were<sup>485</sup>GPLNFPTPSE<sup>494</sup>, <sup>555</sup>FPLAPSQNMG<sup>564</sup>, <sup>575</sup>EVLSEISDIL<sup>584</sup> and <sup>585</sup>NDTPAPVS<sup>593</sup>. These monoclonal antibodies were observed to be able to react specifically with 8 strains of the PRRSV lineage by indirect immunofluorescence assay, but they did not react with the lineage 1 and lineage 5 strains. This study provided significant research materials for the differential diagnosis of and biological research on isolated PRRSV antigens.

**Keywords:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus; nonstructural protein 2; monoclonal antibody; B cell epitopes

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染可导致

仔猪死亡和怀孕母猪繁殖障碍, 造成较大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。PRRSV 是一种单股正链 RNA 病毒, 分为 PRRSV-1 (欧洲型) 和 PRRSV-2 (美洲型) 2 个种, 我国流行的主要是 PRRSV-2, 存在多个基因亚型 (谱系)<sup>[3-4]</sup>。1996 年, 中国分离出属于谱系 5 的 PRRSV 毒株<sup>[5]</sup>。2006 年, 我国暴发高致病性 PRRSV (谱系 8), 其非结构蛋白 2 (NSP2) 超变区存在特征性的 30 个氨基酸不连续缺失<sup>[6]</sup>。2013 年后出现类 NADC30 毒株和类 NADC34 毒株 (谱系 1)<sup>[7-8]</sup>。不同

收稿日期: 2024-03-18; 修回日期: 2024-12-03

基金项目: 江苏省自主创新研发基金项目 (CX (22) 1011); 国家生猪产业技术体系专项 (CARS-35); 国家自然科学基金项目 (32230103)

第一作者: 任语馨, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 姜平, 教授, 博导, 主要从事动物传染病学方面的研究, E-mail: jiangp@njau.edu.cn。

基因亚型毒株抗原性存在一定差异,商品疫苗交叉保护效果不理想<sup>[9]</sup>。

PRRSV 基因组约 15 kb, 包含 11 个开放阅读框, 编码 16 个非结构蛋白和 8 个结构蛋白<sup>[10]</sup>。PRRSV 的 NSP2 蛋白是 1 个多结构域蛋白, 它由 ORF1a 编码, 具有 1 个假定的半胱氨酸蛋白酶结构域 (PL2)、1 个功能未知的 500 至 700 个氨基酸的中间高变异区、1 个跨膜结构域以及 1 个大小不确定的 C 端尾部<sup>[11]</sup>。NSP2 在病毒复制和转录复合体 (RTC) 组装<sup>[12]</sup>、病毒 RNA 合成<sup>[13]</sup>、炎症调节<sup>[14]</sup>、宿主先天免疫拮抗<sup>[15]</sup> 和可能的中和抗体诱导中都发挥了作用<sup>[16]</sup>。同时, NSP2 具有重组、缺失和高突变的特点, 常作为流行病学检测和诊断的靶标<sup>[17]</sup>。本研究通过大肠杆菌表达系统成功获得重组 NSP2 蛋白, 制备得到 5 株分泌性和反应性良好的 NSP2 单克隆抗体, 鉴定到 4 个未报道过的 B 细胞抗原表位, 为 PRRSV 分离毒株抗原鉴别诊断和基础性研究提供了有意义的材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

PRRSV BB0907 毒株、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和大肠杆菌 BL21 (DE3)、PRRSV N 蛋白单克隆抗体、小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0)、pET-28a (+) 载体均由本实验室保存。SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 (6~8 周龄) 购自扬州大学实验动物中心。

HRP-羊抗鼠 IgG (H+L) 购自碧云天生物技术有限公司; 2 $\times$ Phanta Max Master Mix 和 180 kDa Pres-tained Protein Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、HAT 和 HT 购自 Sigma 公司; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和 T4 连接酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司; HisSep Ni-NTA Agarose Resin 购自上海翊圣生物科技有限公司; 小鼠单克隆抗体亚型鉴定 ELISA 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。

### 1.2 pET-28a-tNSP2 重组质粒构建

根据 GenBank 上 PRRSV BB0907 (GenBank: HQ315835. 1) NSP2 的基因序列, 经抗原性分析后, 针对高变区的 1 183~1 779 位基因片段 (tNSP2) 设计上下游引物, 上游引物为 tNSP2-F: 5'-CGCG-GATCCGATTTGCTAAAAGTACCCAACACC-3'; 下游引物为 tNSP2-R: 5'-CCGCTCGAGTGACACAGGTG-CAGGGTTGGTGTGTC-3', 分别包含 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点, 用于扩增 tNSP2 基因片段, 片段大小为

597 bp。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 循环 35 次; 72  $^{\circ}$ C 5 min。回收基因片段, 双酶切后连接到载体 pET-28a 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中。提取质粒, 双酶切鉴定后送至南京金斯瑞生物公司进行测序, 质粒保存于 -20  $^{\circ}$ C。

### 1.3 重组 NSP2 蛋白诱导表达、纯化与鉴定

转化重组质粒到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态中, 挑取单菌落于 500  $\mu$ L 的 LB 液体培养基 (含有卡那霉素) 中进行预培养, 将预培养的菌液接入 3 mL 的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、160 r/min 进行表达, 在菌液  $OD_{600\text{nm}}$  值达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 进行诱导, 使其终浓度为 1 mmol/L, 然后继续培养 6 h。为了对重组蛋白的表达形式进行 SDS-PAGE 鉴定, 收集诱导表达的菌体进行超声破碎, 1 300 r/min 离心 1 min 后收集上清液和沉淀制备样品进行电泳。使用镍柱纯化 NSP2 重组蛋白, 将纯化的蛋白浓缩后进行浓度测定, 重组 NSP2 蛋白于 -80  $^{\circ}$ C 冻存。利用 PRRSV 阳性血清对重组蛋白的抗原性进行 Western blot 鉴定。

### 1.4 PRRSV NSP2 蛋白单克隆抗体制备

#### 1.4.1 动物免疫

参考文献 [18], 将纯化好的 tNSP2 蛋白与 ISA206 佐剂 1:1 乳化均匀, 乳化后对 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行皮下多点注射。免疫剂量为 50  $\mu$ g/只, 每 3 周重复进行 1 次免疫, 3 次免疫后进行效价测定, 若血清效价  $\geq 10\ 000$  即可进行冲击免疫, 即融合前 3 d 腹腔注射重组蛋白 100  $\mu$ g。

#### 1.4.2 细胞融合与杂交瘤细胞株建立

参考文献 [19], 分离免疫小鼠的脾细胞, 在 PEG4000 的作用下与 SP2/0 细胞按照 7:1~5:1 的比例进行融合。为了筛选出成功融合的阳性单克隆细胞, 用 2% HAT 选择性培养基培养 7~9 d, 选取单团细胞利用间接 ELISA 方法检测 NSP2 蛋白抗体, 阳性单克隆细胞挑选状态好的进行亚克隆, 亚克隆得到的 100% 阳性的杂交瘤细胞株进行扩大培养, 将培养到 20 代的细胞冻存于液氮中。

#### 1.4.3 间接 ELISA 筛选阳性单克隆细胞

将酶标板用重组 NSP2 蛋白包被, 收集的单抗细胞上清液作为一抗, HRP-羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗, 1:200 倍稀释的免疫小鼠血清和 SP2/0 细胞上清液分别作为阳性对照和阴性对照。酶标仪测定每孔  $OD_{450\text{nm}}$  读数,  $P/N = \text{阳性孔 } OD \text{ 值} / \text{阴性孔 } OD \text{ 值}$ ,  $P/N > 2.1$  判定为阳性。

#### 1.4.4 腹水制备

参考文献 [20], 制备腹水前先在 5 周龄 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.5 mL 无菌液体石蜡, 7 d 后吹下一

整瓶 T25 细胞瓶的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔，之后的 6~10 d 进行观察，等小鼠被毛蓬乱、腹部隆起后即可采集腹水。5 000 g 离心 4 min 后分离上清液保存于-80 ℃。

### 1.5 单克隆抗体生物学特性鉴定

#### 1.5.1 单抗亚型鉴定及抗体分泌稳定性测定

5 株单抗的亚型鉴定按照小鼠单克隆抗体亚型鉴定 ELISA 试剂盒 (Proteintech 公司) 说明书进行。

为了分析单抗的分泌稳定性，用间接 ELISA 的方法检测不同代次 (第 5、10、15、20 代) 单抗细胞的上清液效价。

#### 1.5.2 Western blot 鉴定

以 0.1 感染复数 (MOI) 的感染剂量感染 PRRSV BB0907 36 h 后收取的 Marc-145 细胞样品和原核系统表达的重组 NSP2 蛋白为抗原，同时设置空载体表达的蛋白和未接毒的 Marc-145 细胞作为相应的阴性对照。以制备的单抗上清液为一抗，HRP-羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗，进行 Western blot 鉴定

单抗反应性。

#### 1.5.3 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定

参考文献 [21]，将 PRRSV 接种至铺于 96 孔板的 Marc-145 细胞中，置于 37 ℃ 感染 36 h，接毒剂量为 0.1 MOI。随后弃掉培养基，用 PBS 洗涤后加入 4% 多聚甲醛固定，洗涤后加入单抗细胞培养上清液进行孵育，置于 37 ℃ 孵育 1 h 或于 4 ℃ 过夜孵育，洗涤后与 HRP-羊抗鼠 IgG (H+L) 进行作用，37 ℃ 孵育 45 min，用倒置荧光显微镜观察抗体与病毒反应情况。

### 1.6 单克隆抗体表位鉴定

参考文献 [22]，根据 tNSP2 基因序列设计了 10 个截短体引物，引物序列如表 1 所示。以重组质粒 pET-28a-tNSP2 为模板，PCR 扩增 NSP2 基因截短体，克隆至 pET-28a 载体，利用大肠杆菌表达系统进行诱导表达，用 His 单抗和研制的单抗分别进行 Western blot，鉴定各单抗针对的抗原表位。

表 1 PRRSV NSP2 基因截短体 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增区域/aa	基因长度/bp
L0	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGCTCGGATGGTTCGGAAAGTT	395~494	300
R1	F: CGCGGATCCGGTCCCCTCAACTTTCCGACA R: CCGCTCGAGTGACACAGGTGCAGGGTTGGT	485~593	327
L1	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGCAGCTTGGGGACAAATTGCCA	395~514	360
L2	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGAACTGGTGCTGACCCAATCAA	395~524	390
L3	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGCGTTGTGTCACAGTTCTACG	395~534	420
L4	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGCAAATCTAAAGGCTCATCCTG	395~544	450
L5	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGAGCCTTATATTCCGTTTGTGA	395~554	480
L6	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGGCCCATGTTCTGCGATGGTGTC	395~564	510
L7	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGCTCAGCTTCTTGCCCCCCCGC	395~574	540
L8	F: CGCGGATCCGATTTGCTAAAAGTCCAAAC R: CCGCTCGAGTAGTATATCCGAGATTTCACT	395~584	570

注：下划线为酶切位点。

### 1.7 NSP2 单抗抗原表位氨基酸位点比对分析

从 GenBank 数据库下载 15 株来自谱系 1、3、5

和 8 的 PRRSV 毒株 (BB0907、SY0608、JXA1、HuN4、CH-1a、QYYZ、GM2、BJ-4、S1、VR2332、

FJ1402、NADC30、NADC31、AHJ4、IA - 2014 - NADC34), 利用 BioEdit 软件比对经过表位鉴定得到的 B 细胞表位所在的氨基酸序列的保守性。

### 1.8 NSP2 单抗与不同谱系毒株的反应性

选择抗原表位不相同的单克隆抗体与不同谱系的 PRRSV 毒株 (BB0907、FJ1402、S1) 分别进行 IFA, 鉴定其与不同谱系毒株间的反应性, 对其抗原表位保守性进行分析。

## 2 结果

### 2.1 NSP2 蛋白基因扩增及重组质粒的构建

NSP2 基因超变区基因片段 (tNSP2) PCR 产物克隆至 pET-28a 载体, 获得重组质粒 pET-28a-tNSP2, 由图 1 可知, 目的片段酶切后呈现条带的大小与目的基因一致。

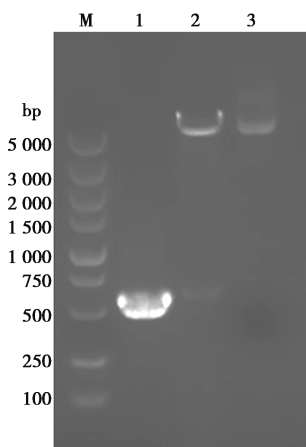


图 1 PRRSV tNSP2 基因 PCR 扩增及重组质粒 pET-28a-tNSP2 酶切鉴定

### 2.2 重组 NSP2 蛋白表达、纯化及鉴定

收集诱导表达的菌体进行超声裂解, 离心后收集上清液, 通过镍柱进行纯化。SDS-PAGE 鉴定结果显示, tNSP2 重组蛋白大小约为 30 ku, 与预期蛋白大小一致 (图 2A)。Western blot 结果显示, tNSP2 重组蛋白与 PRRSV 阳性血清反应性良好 (图 2B)。

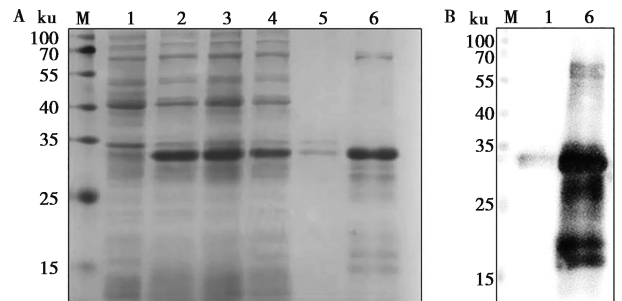


图 2 PRRSV 重组 NSP2 蛋白表达鉴定 SDS-PAGE (A) 及 Western blot 分析 (B)

### 2.3 单克隆抗体制备及效价测定

小鼠免疫接种 tNSP2 重组蛋白 3 次后, 血清 NSP2 蛋白 ELISA 抗体效价达 1 : 10 000 以上。利用 NSP2 间接 ELISA 将细胞融合后的单克隆细胞进行筛选, 然后亚克隆筛选到的阳性杂交瘤细胞, 最终获得 3D6、6B2、6C8、8C2 和 8H6 共 5 株 PRRSV NSP2 单克隆抗体杂交瘤细胞。单抗细胞 ELISA 抗体效价在 20 代以内均大于 1 : 6 400 且较稳定。用 5 株细胞分别制备小鼠腹水, ELISA 抗体效价均  $\geq 1 : 216 000$  (表 2)。

表 2 5 株单克隆抗体杂交瘤细胞培养上清液及其小鼠腹水 ELISA 抗体效价测定

单克隆抗体	代次				腹水效价
	P5	P10	P15	P20	
3D6	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 25 600	1 : 51 200	1 : 216 000
6B2	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 216 000
6C8	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 1 024 000
8C2	1 : 102 400	1 : 51 200	1 : 102 400	1 : 102 400	1 : 1 024 000
8H6	1 : 102 400	1 : 102 400	1 : 51 200	1 : 102 400	1 : 216 000

### 2.4 单克隆抗体亚型鉴定

重链类型为 IgG1 的单抗有 3D6、6B2、6C8, 重链类型为 IgG2b 的单抗有 8C2, 重链类型为 IgG2a 的

单抗有 8H6, 所有单抗轻链类型都为 Kappa 型 (表 3)。

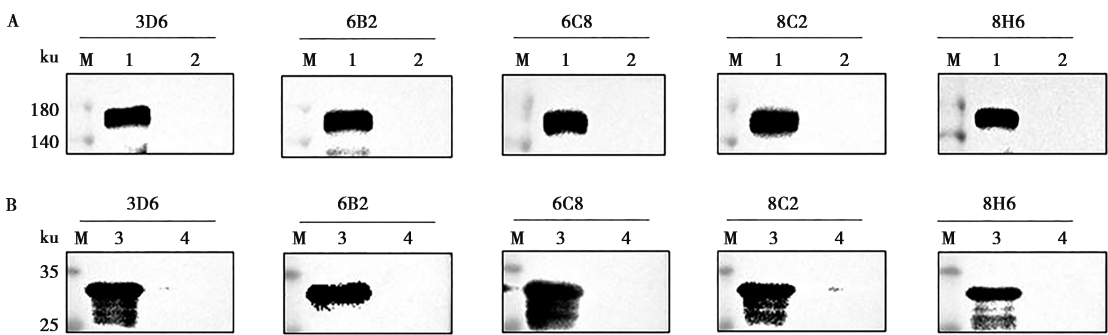
表 3 5株单克隆抗体亚型的鉴定

单克隆抗体	亚类/型							
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
3D6	1.55	0.168	0.337	0.16	0.092	0.063	0.907	0.073
6B2	1.565	0.306	0.685	0.099	0.087	0.11	0.934	0.061
6C8	1.616	0.212	0.551	0.063	0.068	0.066	1.059	0.061
8C2	0.111	0.135	1.662	0.1	0.113	0.077	0.975	0.092
8H6	0.204	1.575	0.469	0.15	0.08	0.068	1.155	0.089

### 2.5 单克隆抗体 Western blot 反应性鉴定

5株单抗均能与 PRRSV BB0907 毒株和原核表达的重组 NSP2 蛋白发生特异性反应，未接毒的 Marc-

145 细胞和大肠杆菌 BL21 宿主菌则不与之发生反应 (图 3)。



1. PRRSV 感染 36 h 后细胞样品; 2. Marc-145 细胞 (mock) 样品; 3. 重组 NSP2 蛋白; 4. 空载诱导全菌。

图 3 5株单克隆抗体与 PRRSV (A) 和 NSP2 重组蛋白 (B) 反应特性的 Western blot 鉴定

### 2.6 单克隆抗体 IFA 反应性鉴定

5株 NSP2 单抗与 PRRSV BB0907 毒株感染细胞发生良好的特异性反应，产生绿色荧光，未接毒的

Marc-145 细胞则观察不到绿色荧光，说明不能与之发生特异性反应 (图 4)。

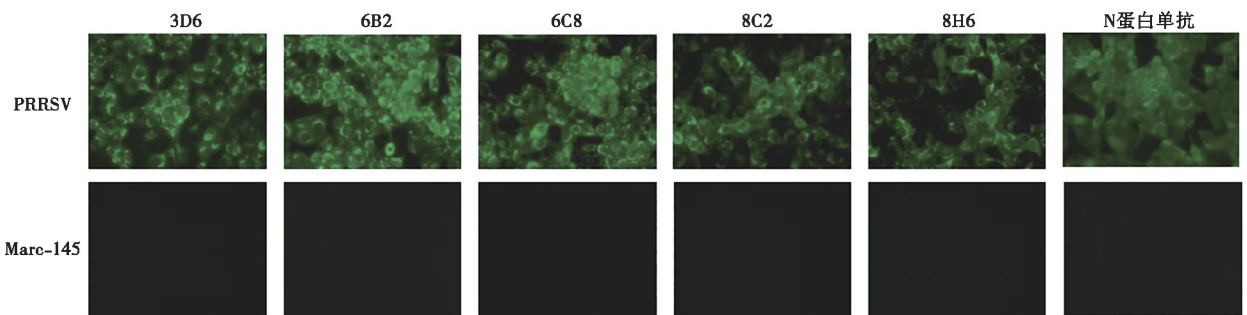
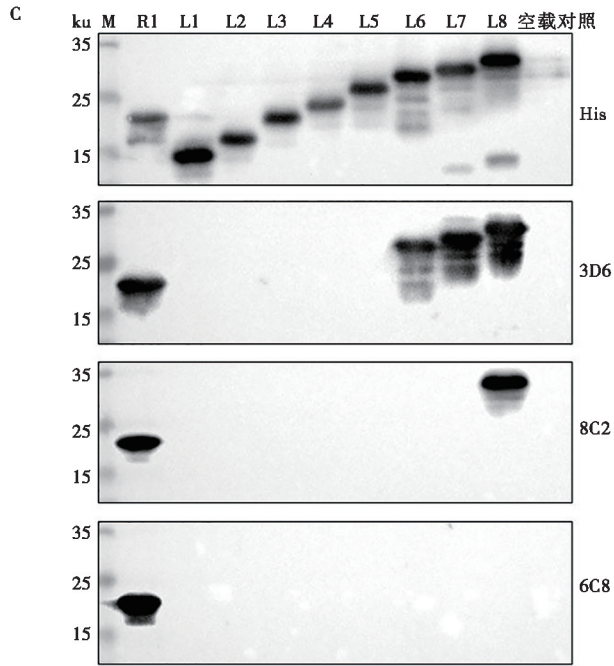
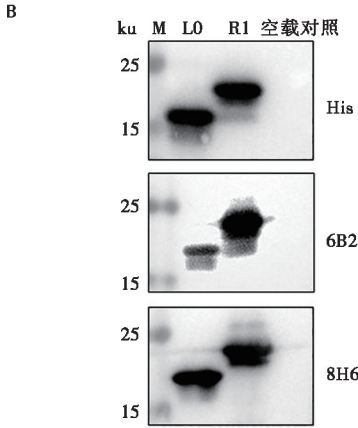
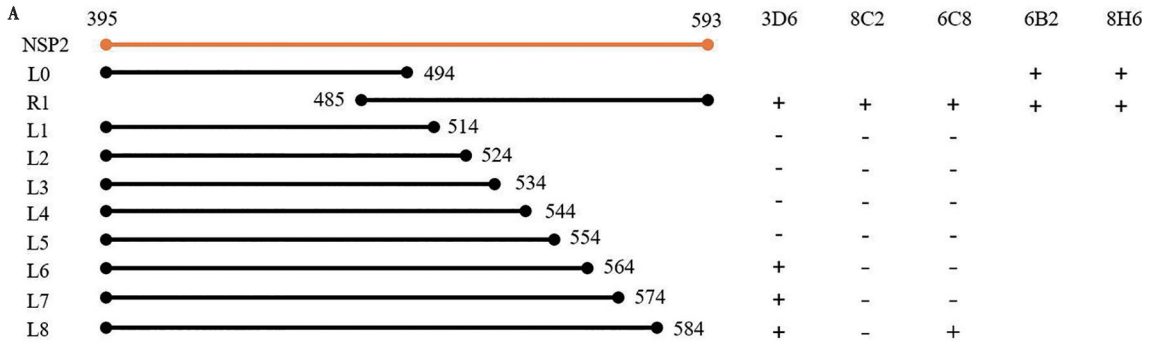


图 4 单克隆抗体 IFA 反应性鉴定 (200×)

### 2.7 单克隆抗体表位的鉴定

如图 5A 的截短策略构建了 10 条 NSP2 蛋白截短体，以鉴定单抗所识别的抗原表位。Western blot 鉴定结果见图 5B、C 所示，His 单抗鉴定截短体大小正

确。5株 NSP2 蛋白单克隆抗体中，6B2、8H6 识别表位<sup>485</sup>GPLNFPTPSE<sup>494</sup>，3D6 识别表位<sup>555</sup>FPLAPSQN-MG<sup>564</sup>，8C2 识别表位<sup>575</sup>EVLSEISDIL<sup>584</sup>，6C8 识别表位<sup>585</sup>NDTPAPVS<sup>593</sup>。



A. PRRSV NSP2 蛋白截短体; B. 单抗 6B2、8H6 识别区域; C. 单抗 3D6、8C2、6C8 识别区域。

图 5 NSP2 蛋白单克隆抗体截短体构建策略及表位鉴定

### 2.8 PRRSV NSP2 蛋白抗原表位氨基酸位点比对

采用 BioEdit 软件对不同谱系毒株 NSP2 序列进行分析, 结果如图 6 所示, BB0907 毒株所在谱系 8

的抗原表位的氨基酸序列在谱系内有较好的保守性, 与其他谱系毒株相比较有较强的特异性。

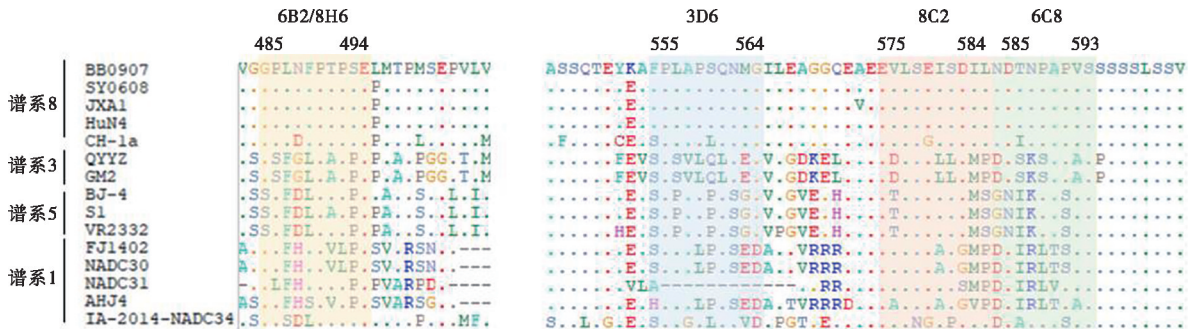


图 6 PRRSV NSP2 蛋白单克隆抗体抗原表位氨基酸序列比对分析

## 2.9 NSP2 单抗与不同谱系 PRRSV 的 IFA 反应

选择抗原表位不相同的 4 株单克隆抗体 6B2、6C8、3D6 和 8C2 与 BB0907 (谱系 8)、FJ1402 (谱

系 1)、S1 (谱系 5) 毒株分别进行反应, 4 株单抗与 BB0907 毒株发生特异性反应, 与 FJ1402 和 S1 毒株则不发生特异性反应 (图 7)。

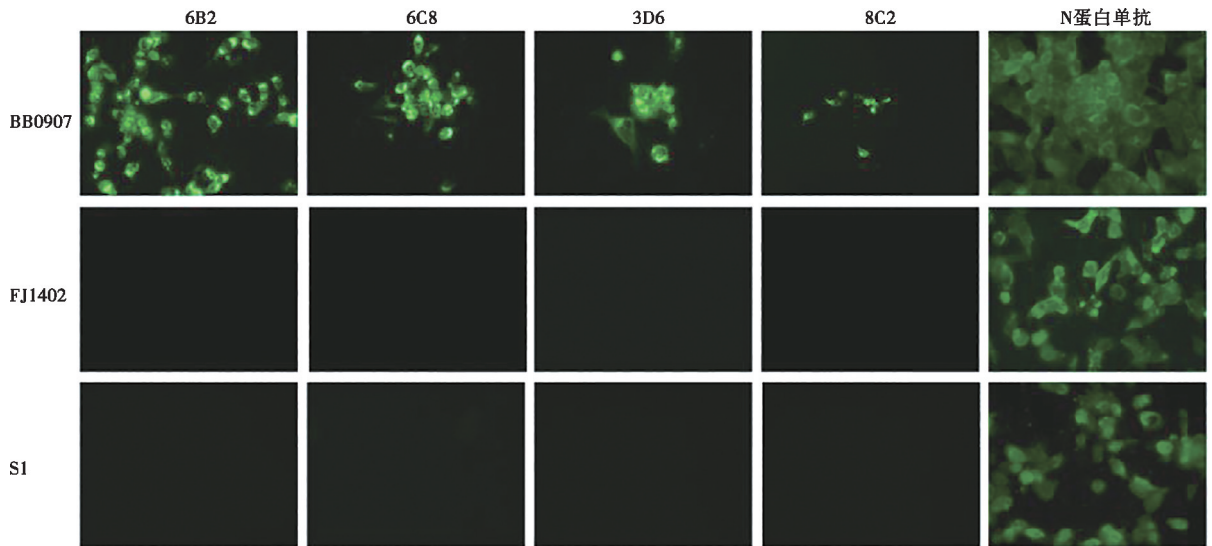


图 7 NSP2 单抗与不同基因亚型 PRRSV 的 IFA 反应性鉴定 (400×)

## 3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征严重影响我国养猪业的经济效益, 由于 PRRSV 具有免疫抑制和高突变重组率的特点, 给疫苗防控带来了巨大挑战<sup>[23]</sup>。为了鉴定不同基因谱系的流行毒株, 本研究选择高致病性 PRRSV 毒株 BB0907 的 NSP2 高变区基因, 研制了 5 株稳定分泌的单克隆抗体, 均只与谱系 8 毒株发生 IFA 反应, 不与谱系 1 和谱系 5 毒株反应, 为建立不同谱系毒株的诊断方法提供了重要生物材料。

NSP2 对 PRRSV 的致病性有着重要影响, 例如, 它能参与病毒复制, 促进形成病毒复制复合体<sup>[24]</sup>; NSP2 的 PLP2 区能够通过多种途径抑制干扰素- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 和干扰素刺激基因 15 (ISG15) 的产生<sup>[25-26]</sup>, 并阻止 ISG15 和宿主蛋白的结合<sup>[14]</sup>; 此外, 有研究报道 NSP2 可能通过内质网应激途径诱导细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。作为基因组中变异最大的功能蛋白, NSP2 在不同谱系毒株间存在巨大差异, 这些差异对病毒的致病性产生影响<sup>[29]</sup>。同时, NSP2 具有丰富的 B 细胞表位, 临床感染发生时, 猪血清中的 NSP2 蛋白抗体产生时间较早, 是 PRRSV 感染诊断的理想靶标<sup>[30]</sup>。

单克隆抗体技术由于其高度的特异性和可以长期大量分泌抗体, 被用于研究、诊断和治疗等多个方面<sup>[31]</sup>。目前, 已有一些关于 PRRSV NSP2 单克隆抗体及其 B 细胞表位的相关报道。Yan 等<sup>[32]</sup>制备了 6

株 NSP2 单抗, 利用合成肽技术鉴定到 6 个抗原表位。Bi 等<sup>[33]</sup>制备了 3 株 NSP2 单抗, 识别了 3 个抗原表位。Oleksiewicz 等<sup>[34]</sup>利用噬菌体展示文库证明了欧洲型 PRRSV 毒株的 Nsp2 蛋白中存在大量 B 细胞表位。de Lima 等<sup>[6]</sup>通过肽扫描技术鉴定到了 18 个美洲型 PRRSV 毒株 NSP2 蛋白的 B 细胞线性表位。本研究通过大肠杆菌对 NSP2 蛋白高变区截短表达, 研制了 5 株稳定分泌的单克隆抗体, 鉴定出 4 个抗原表位<sup>485 GPLNFPTPSE<sup>494</sup>、555 FPLAPSQNMG<sup>564</sup>、575 EVLSEISDIL<sup>584</sup> 和 585 NDTPAPVS<sup>593</sup></sup>, 与上述报道均不完全一致, 从而丰富了 NSP2 蛋白抗原结构的理论基础。

## 参考文献:

- [1] ZHANG Q, BAI J, HOU H, et al. A novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus with significant variation in cell adaption and pathogenicity [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 208: 150-158.
- [2] 张杰, 张路捷, 周昊然, 等. 2021—2022 年华东地区猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子流行病学调查 [J]. *中国兽医科学*, 2024, 54 (4): 519-525.
- [3] BRINTON M A, GULYAEVA A A, BALASURIYA U B R, et al. ICTV virus taxonomy profile: Arteriviridae 2021 [J]. *J Gen Virol*, 2021, 102 (8): 001632.
- [4] GAO J C, XIONG J Y, YE C, et al. Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996-2016 [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 208: 164-172.
- [5] KARNIYCHUK U U, GELDHOF M, VANHEE M, et al. Pathogen-

- esis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate [J]. *BMC Vet Res*, 2010, 6: 30.
- [6] DE LIMA M, PATTNAIK A K, FLORES E F, et al. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 2006, 353 (2): 410-421.
- [7] ZHANG H L, ZHANG W L, XIANG L R, et al. Emergence of novel porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in China [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 222: 105-108.
- [8] XU H, SONG S, ZHAO J, et al. A potential endemic strain in China: NADC34-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67 (4): 1730-1738.
- [9] 周洛译, 孙跃峰, 侯石桐, 等. 猪繁殖与呼吸综合征疫苗的发展现状及 mRNA 疫苗前景 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44 (12): 93-98.
- [10] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 129-154.
- [11] HAN J, WANG Y, FAABERG K S. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2006, 122 (1/2): 175-182.
- [12] SONG J, LIU Y, GAO P, et al. Mapping the nonstructural protein interaction network of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2018, 92 (24): e01112-18.
- [13] SONG J, GAO P, KONG C, et al. The nsp2 hypervariable region of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXwn06 is associated with viral cellular tropism to primary porcine alveolar macrophages [J]. *J Virol*, 2019, 93 (24): e01436-19.
- [14] SUN Z, LI Y, RANSBURGH R, et al. Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15 [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (7): 3839-3850.
- [15] SU J, ZHOU L, HE B, et al. Nsp2 and GP5-M of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contribute to targets for neutralizing antibodies [J]. *Virologica Sinica*, 2019, 34 (6): 631-640.
- [16] KONG C, LI D, HU Y, et al. The genetic variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicase protein nsp2 modulates viral virulence and persistence [J]. *J Virol*, 2023, 97 (3): e0168922.
- [17] ZHAO M, SHA H, ZHANG H, et al. TRIM4-mediated ubiquitination of NSP2 restricts porcine reproductive and respiratory syndrome virus proliferation [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18 (1): 208.
- [18] 袁丽, 孙杨杨, 张路捷, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP3 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (8): 3424-3434.
- [19] 王俊荣, 张路捷, 胡永新, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备及其 B 细胞抗原表位的鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53 (8): 947-955.
- [20] 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.
- [21] 尹国英, 高雁妮, 夏婷婷, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白在昆虫细胞中的可溶性表达 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (6): 99-103.
- [22] 王梦婕, 张杰, 孙杨杨, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (6): 91-96.
- [23] LIU B, LUO L, SHI Z, et al. Research progress of porcine reproductive and respiratory syndrome virus NSP2 protein [J]. *Viruses*, 2023, 15 (12): 2310.
- [24] POSTHUMA C C, PEDERSEN K W, LU Z, et al. Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82 (9): 4480-4491.
- [25] LI H, ZHENG Z, ZHOU P, et al. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes interferon regulatory factor 3 activation [J]. *The Journal of General Virology*, 2010, 91 (Pt 12): 2947-2958.
- [26] VAN KASTEREN P B, BEUGELING C, NINABER D K, et al. Arterivirus and nairovirus ovarian tumor domain-containing deubiquitinases target activated RIG-I to control innate immune signaling [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (2): 773-785.
- [27] MA Z, WANG Y, ZHAO H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 induces apoptosis dependent on its 3C-like serine protease activity [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e69387.
- [28] WANG L, ZHOU L, ZHANG H, et al. Interactome profile of the host cellular proteins and the nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e99176.
- [29] ZHOU L, ZHANG J, ZENG J, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence [J]. *J Virol*, 2009, 83 (10): 5156-5167.
- [30] 邵清源. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp2 蛋白和 Nsp4 蛋白单克隆抗体的制备 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [31] NELSON P N, REYNOLDS G M, WALDRON E E, et al. Monoclonal antibodies [J]. *Molecular Pathology*, 2000, 53 (3): 111-117.
- [32] YAN Y, GUO X, GE X, et al. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2007, 126 (1/2): 207-215.
- [33] BI C, SHAO Z, LI J, et al. Identification of novel epitopes targeting non-structural protein 2 of PRRSV using monoclonal antibodies [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (6): 2689-2699.
- [34] OLEKSIWICZ M B, BØTNER A, TOFT P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75 (7): 3277-3290.