

赵桐, 潘梦娇, 刘克森, 等. 伪狂犬病病毒 VHS 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 99-106.

ZHAO T, PAN M J, LIU K S, et al. Monoclonal antibodies preparation and antigenic epitope identification of VHS protein of pseudorabies virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 99-106.

伪狂犬病病毒 VHS 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定

赵桐, 潘梦娇, 刘克森, 白娟, 马梓承*, 刘星*

(南京农业大学动物医学院/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) VHS 蛋白单克隆抗体, 通过原核表达系统将目的基因克隆至原核表达载体 pET-32a (+), 获得 pET-32a-VHS 重组质粒, 成功制备了 PRV VHS 重组蛋白, 将纯化后的蛋白作为免疫原接种 BALB/c 雌鼠, 经过细胞融合、间接 ELISA 筛选和 3 轮亚克隆获得了 2 株 PRV VHS 蛋白的单克隆抗体, 分别命名为 1H8 和 4C3。使用间接 ELISA 方法检测, 2 株 VHS 单抗细胞均能稳定分泌抗体, 且腹水抗体效价均达到 1 : 409 600。1H8 和 4C3 的轻链均属于 Kappa 型, 重链皆为 IgG1 亚类。Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 显示, 2 株杂交瘤细胞株分泌的单抗均能与 PRV 病毒蛋白发生特异性反应。通过 VHS 蛋白的截短表达和 Western blot 鉴定出 1H8 单抗可以识别抗原表位²⁴¹VAPEDV-KLKY²⁵⁰, 单抗 4C3 可以识别抗原表位¹⁰³RADGDGAADAPP¹¹⁴。本研究制备出 2 株 VHS 的单克隆抗体, 鉴定出 2 个新的抗原表位, 为后续研究 PRV VHS 蛋白功能及其在病毒感染和免疫应答中的作用提供了重要依据。

关键词: 伪狂犬病病毒; VHS 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(2025)05-0099-08

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

ZHAO Tong, PAN Mengjiao, LIU Kesen, BAI Juan, MA Zicheng*, LIU Xing*

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

Abstract: This study was to prepare monoclonal antibody against Pseudorabies virus (PRV) VHS protein. The target gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a (+) through the prokaryotic expression system, pET-32a-VHS recombinant plasmids were obtained, and PRV VHS recombinant proteins were successfully prepared. The proteins were purified and inoculated into BALB/c female mice as immunogens. After cell fusion, indirect ELISA screening and 3 rounds of subcloning, two monoclonal antibodies to the PRV VHS proteins were obtained, and were named 1H8 and 4C3, respectively. The indirect ELISA assay showed that both VHS monoclonal antibody strains could secrete antibody steadily, and the titer of the ascites antibody reached 1 : 409 600. The light chains of 1H8 and 4C3 belonged to the Kappa type, and the heavy chains belonged to the IgG1 subclass. Western blot and the indirect immunofluorescence assay (IFA) showed that the monoclonal antibodies secreted by the two hybridoma cell lines could react specifically with the PRV virus protein. According to the truncated expression of the VHS protein and Western blot analysis, the 1H8 monoclonal antibody could recognize epitope²⁴¹VAPEDV-KLKY²⁵⁰, and the 4C3 monoclonal antibody could recognize epitope¹⁰³RADGDGAADAPP¹¹⁴. In summary, two monoclonal antibodies to VHS were prepared and two new cell epitopes were identified here. This provided important material support for further research on the function of PRV VHS proteins and their role in viral infection and immune response.

Keywords: PRV; VHS protein; monoclonal antibody; antigenic epitope

收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2025-03-19

基金项目: 江苏省杰出青年基金项目 (BK20230039, BK20241567); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX (23) 3073); 国家自然科学基金面上项目 (32272985, 32402870)

第一作者: 赵桐, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 刘星, 教授, 主要从事动物传染病学的基础与研究工作, E-mail: xingliu@njau.edu.cn; 马梓承, 讲师, 主要从事动物传染病学的基础与研究工作, E-mail: zichengma@njau.edu.cn。

伪狂犬病 (PR) 是由伪狂犬病病毒 (PRV) 感染动物而引起的急性传染病, 其宿主范围广, 包括猪、牛、羊、猫、犬等。猪是 PRV 唯一的天然宿主^[1]。新生仔猪感染 PRV, 临床症状表现为高热、神经症状, 且死亡率高, 也可表现出发热和呼吸系统症状; 怀孕母猪则常出现流产、产死胎和木乃伊胎等症状^[2], 对我国养猪产业造成了巨大的经济损失。此外, 有研究称 PRV 可以直接感染人, 并引起脑炎、角膜炎等症状^[3], 对人类健康也构成了潜在威胁。

PRV 属于疱疹病毒科, 基因组大小约 150 kb, 为双链 DNA^[4], PRV 基因组包含超过 70 个开放阅读框, 可以编码约 70 种蛋白^[5]。其中 PRV 的宿主关闭蛋白 (VHS) 是一个 365 个氨基酸的多肽, 蛋白大小约为 40 kDa^[6]。VHS 蛋白因其能够通过抑制 mRNA 的活性使宿主细胞中的蛋白质合成减少而得名。Liu 等^[7]研究发现, PRV VHS 不仅可以降解 mRNA, 还可以降解 rRNA。翻译起始因子 eIF4H 和 eIF4B 能够刺激 PRV VHS 的核糖核酸酶活性^[8]。Lin 等^[9]研究发现缺失 VHS 的 PRV 在细胞中的复制能力和对小鼠的致病能力都有明显下降, 表明 VHS 是病毒的重要毒力相关蛋白。然而, 目前关于 PRV VHS 的功能和致病机制尚不清楚, 还有待进一步研究。本研究通过大肠杆菌表达系统获得了 PRV VHS 重组蛋白, 将其免疫小鼠, 获得了 2 株单克隆抗体, 为未来研究 PRV VHS 蛋白的功能提供了材料支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料

大肠杆菌 DH5 α 及大肠杆菌 BL21、HEK293T 细胞、SP2/0 骨髓瘤细胞、Vero 细胞、pET-32a (+) 载体和 PRV ZJ01 毒株, 本实验室保存; 6~8 周龄的雌性癌症研究所 (ICR) 小鼠和 BALB/c 小鼠, 购自南京卡文斯生物技术有限公司; 聚乙二醇 (PEG4000)、HAT、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 Sigma 公司; 180 kDa Prestained Protein Marker 和 2 \times Phanta Max Master Mix, 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、T4 DNA Ligase、胎牛血清和 RPMI-1640 培养基, 购自赛默飞世尔科技公司; 标记的山羊抗小鼠 (IgG-HRP、IgG-FITC) 抗体及小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, 购自 Proteintech 公司; HisSep Ni-NTA Agarose Resin 购自翌圣生物技术有限公司; 病毒 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒, 购自康为世纪生物技术有限公司。

终校

1.2 重组质粒的构建与鉴定

根据 PRV ZJ01 毒株 (GenBank: KM061380.1) VHS 的基因序列, 使用 SnapGene 软件设计了基因的引物, 并在引物上下游分别加入酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III, 上游引物 UL41-*Bam*H I-F: 5'-TATG-GATCCATGGGGCTCTTTGGCCTTTTAAA-3', 下游引物 UL41-*Hind* III-R: 5'-TATAAGCTTTTTTCTCCTAT-GGGCGTTACAGT-3'。提取 PRV ZJ01 毒株的病毒 DNA, 将其作为 DNA 模板, 利用上下游引物进行 PCR 扩增, 得到目的基因片段。双酶切目的基因片段和 pET-32a (+) 载体, 后将载体和 VHS 基因片段进行连接转化, 待菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定结果均为阳性后, 将重组质粒保存于-40 $^{\circ}$ C。

1.3 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

将重组质粒 pET-32a-VHS 转化至 BL21, 从中挑取单个菌落于 LB 液体培养基 (含有氨苄青霉素) 中, 并在 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 恒温振荡器中摇菌至菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 值达到 0.6~0.8 后, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的诱导剂 IPTG 继续培养 5 h^[10]。收集菌体, 对其进行超声裂解, 4 $^{\circ}$ C 离心后收集下层沉淀物和上层液体用于制备蛋白样品, 通过 SDS-PAGE 方法鉴定 VHS 重组蛋白表达形式。使用镍柱亲和层析法纯化 VHS 重组蛋白^[11]。通过 Western blot 鉴定 VHS 重组蛋白反应性。

1.4 单克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫

将纯化的 VHS 重组蛋白与 ISA206 佐剂等体积混合并进行乳化。将其皮下多点注射于 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠, 免疫剂量为每只小鼠 100 μ g, 每 2 周免疫 1 次。免疫 3 次后 10 d, 对小鼠尾尖采血, 采用间接 ELISA 检测其血清抗体效价。当效价高于 1:12 800 时, 可以进行冲击免疫, 即在细胞融合前 3~5 d 内, 对小鼠腹腔注射 100 μ g 纯化的 VHS 重组蛋白^[12]。

1.4.2 细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合时, 将小鼠处死, 无菌分离小鼠脾细胞并计数, 将脾细胞与骨髓瘤细胞按 7:1 的比例在 PEG4000 作用下进行细胞融合。融合细胞在 HAT 选择培养基中培养, 6 d 后使用间接 ELISA 检测细胞上清液, 筛选阳性杂交瘤细胞。将阳性杂交瘤细胞进行多次亚克隆, 直至亚克隆后的细胞单团上清液检测结果均为阳性时, 可进行扩大培养, 将传至 20 代的单抗细胞分批冻存于液氮。

1.4.3 间接 ELISA 抗体检测抗体效价

将 VHS 重组蛋白包被于酶标板, 蛋白包被浓度为 2 μ g/mL。使用待检的 VHS 单抗细胞上清液作为

一抗, HRP-羊抗鼠-IgG 作为二抗。将 VHS 重组蛋白冲击免疫后的小鼠血清和 SP2/0 细胞培养上清液分别作为阳性对照和阴性对照; 使用酶标仪检测每孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值, 并计算待检样品 $OD_{450\text{ nm}}$ 值/阴性对照 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 (P/N), 当 $P/N \geq 2.1$ 时, 判定待检 VHS 单抗细胞为阳性, $P/N < 2.1$ 时判定为阴性。

1.4.4 腹水制备

对 7 周龄的 BALB/c 雌鼠腹腔注射无菌液体石蜡, 每只小鼠所用剂量 $500\ \mu\text{L}$ 。约 7 d 后, 再次进行腹腔注射, 每只小鼠注射 1×10^6 个单抗细胞。待小鼠精神不振, 腹部膨胀时, 采集腹水。将腹水 $4\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $6\ \text{min}$, 收集上清液并保存 $-40\ ^\circ\text{C}$ 。

1.5 单克隆抗体的鉴定

1.5.1 杂交瘤细胞株分泌稳定性及腹水效价测定

将 VHS 杂交瘤细胞连续传至 20 代, 细胞上清液每隔 5 代收集 1 次, 利用间接 ELISA 方法检测抗体效价。单抗腹水也通过间接 ELISA 检测抗体效价。

1.5.2 Western blot 分析

将 PRV ZJ01 毒株接种于 HEK293T 细胞, 接毒剂量按感染复数 (MOI) 为 0.1, 感染 24 h 后收取细胞裂解样品, 同时将不接毒细胞裂解样品作为阴性对照。一抗为稀释后的单抗 1H8 和 4C3 腹水, 二抗为稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 进行 Western blot 鉴定 2 株单克隆抗体的反应性。

1.5.3 间接免疫荧光试验 (IFA)

将 PRV ZJ01 毒株接种于 Vero 细胞, 接毒剂量按 $\text{MOI}=0.1$ 。感染 24 h 后细胞在显微镜下可观察到明显病变后, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定。PBS 洗去 4% 多聚甲醛, 加入 0.1% TritonX-100 进行透膜。洗涤后用 3% BSA 溶液进行封闭, 一抗为待检单抗腹水, 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG 作为二抗,

孵育条件均为 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 荧光倒置显微镜下观察结果。

1.5.4 单克隆抗体的亚型鉴定

参照小鼠单克隆抗体的亚型鉴定试剂盒操作说明书检测单克隆抗体亚型。

1.6 抗原表位的鉴定

根据 PRV VHS 基因序列设计一系列截短体引物, 将构建的 pET-32a-VHS 重组质粒作为模板, 进行 PCR 扩增以获得多个 VHS 基因截短体, 将这些截短体与 pET-32a (+) 原核表达载体连接, 并在原核表达系统中进行诱导表达。通过 Western blot 试验, 利用获得的单抗腹水作为一抗, 鉴定出 2 株 VHS 蛋白单抗所识别的表位。

1.7 抗原表位结构模型分析

通过 Phyre2 网站预测 PRV VHS 的空间结构, 使用 PyMol 软件将 2 个抗原表位位置映射到预测的结构模型上, 分析抗原表位在 VHS 蛋白的空间分布特点。

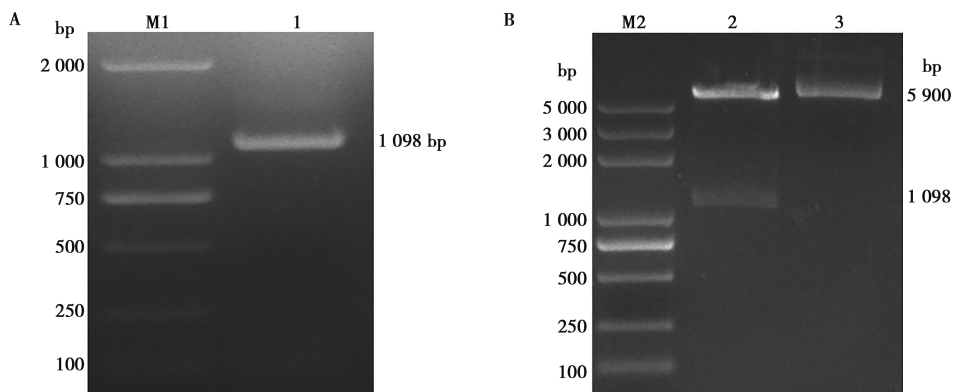
1.8 VHS 蛋白抗原表位氨基酸位点比对

运用 BioEdit 软件对 47 种 PRV 毒株 VHS 蛋白的氨基酸序列进行比对, 并分析 2 种抗原表位序列在多个 PRV 毒株中的保守性。

2 结果与分析

2.1 PRV VHS 基因的扩增和重组质粒的构建

对 PRV VHS 基因进行 PCR 扩增, 如图 1A 所示, 扩增得到 1 条大小约为 $1\ 098\ \text{bp}$ 的条带, 与预期大小一致。将该片段插入 pET-32a 载体中, 利用 *Bam*H I 与 *Hind*III 对得到的重组质粒 pET-32a-VHS 进行双酶切鉴定, 试验结果显示酶切后的线性化质粒和目的片段大小与预期相符 (图 1B)。



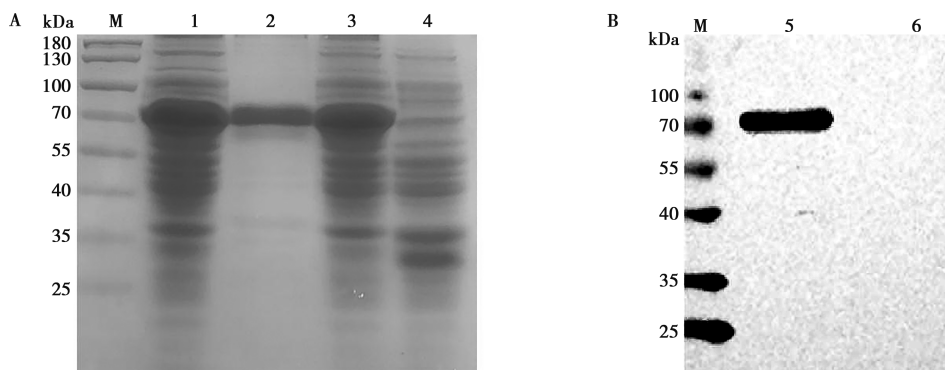
M1. DL2000 DNA Marker; M2. DL5000 DNA Marker; 1. VHS PCR 扩增产物; 2. pET-32a-VHS 酶切产物, 3. pET-32a 酶切产物。

图 1 VHS 基因的 PCR 扩增 (A) 及 pET-32a-VHS 重组质粒的双酶切鉴定 (B)

2.2 重组 VHS 蛋白表达、纯化与鉴定

SDS-PAGE 结果显示, VHS 重组蛋白成功表达, 大小约 70 kDa, 且在包涵体和上清液中均有表达

(图 2A)。通过 Western blot 鉴定, 重组蛋白能与 His 抗体反应, 表明重组蛋白表达成功 (图 2B)。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. pET-32a-VHS 表达菌上清液; 2. pET-32a-VHS 表达菌沉淀; 3. pET-32a-VHS 表达全菌; 4. pET-32a 空载体表达全菌; 5. pET-32a-VHS 纯化蛋白; 6. pET-32a 空载体表达全菌。

图 2 pET-32a-VHS 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定 (A) 和 Western blot 分析 (B)

2.3 杂交瘤细胞株的获得及效价测定

将 VHS 重组蛋白免疫 BALB/c 雌鼠 3 次后, 间接 ELISA 检测小鼠血清效价, 皆达到 1 : 12 800 以上。选择效价最高的小鼠进行细胞融合, 经过间接 ELISA 筛选和多次亚克隆, 最终得到 2 株针对 PRV

VHS 蛋白的单克隆抗体, 分别命名为: 1H8、4C3。将 2 株单抗细胞连续传代, 取上清液进行间接 ELISA 检测, 同时也对单抗细胞制备的腹水进行检测。结果如表 1 所示, 单抗细胞抗体分泌稳定, 单抗腹水效价可达 1 : 409 600。

表 1 杂交瘤细胞上清液和腹水效价检测

单克隆抗体	不同代次细胞培养上清液				腹水
	P5	P10	P15	P20	
1H8	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 12 800	1 : 6 400	1 : 409 600
4C3	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 409 600

2.4 单克隆抗体亚型鉴定

PRV VHS 蛋白的两株单克隆抗体 1H8 和 4C3 亚

型鉴定结果显示, 重链皆为 IgG1 亚类, 轻链类型皆为 Kappa 型 (表 2)。

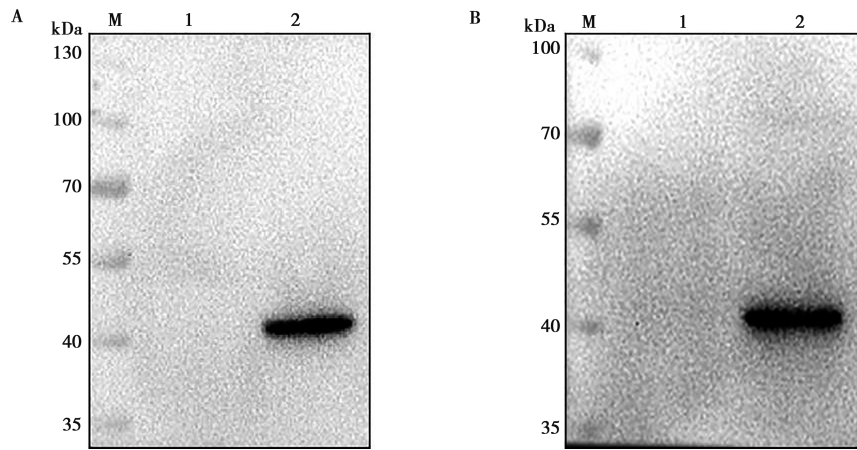
表 2 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体	亚型							
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
1H8	1. 979	0. 068	0. 060	0. 071	0. 072	0. 075	1. 358	0. 058
4C3	2. 851	0. 076	0. 069	0. 065	0. 076	0. 084	1. 508	0. 044

2.5 单克隆抗体 Western blot 特异性鉴定

Western blot 结果如图 3 所示, 2 株单抗能与感染 PRV 的 HEK293T 细胞裂解液发生反应, 而与未感染

PRV 的 HEK293T 细胞裂解液不发生反应, 说明这 2 株单抗均具有较高的特异性。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 未感染 PRV 的 HEK293T 细胞; 2. 感染 PRV 的 HEK293T 细胞。

图 3 单克隆抗体 1H8 (A)、4C3 (B) 与 PRV 反应性鉴定

2.6 单克隆抗体 IFA 鉴定

IFA 鉴定结果如图 4, 2 株单抗均能与感染 PRV 的 Vero 细胞发生反应, 产生特异性绿色荧光, 在未

感染 PRV 组的 Vero 细胞中未观察到荧光, 证明这 2 株单抗均能与 PRV 产生特异性反应。

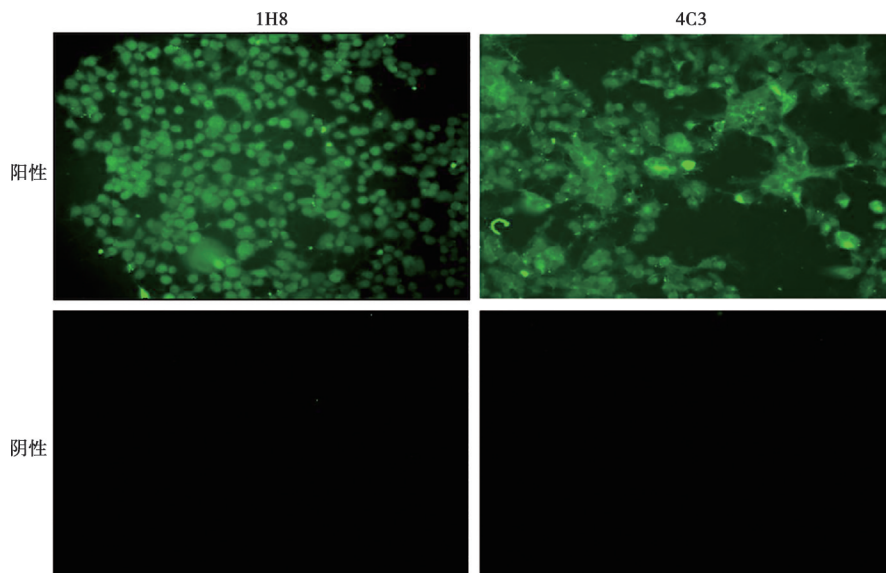
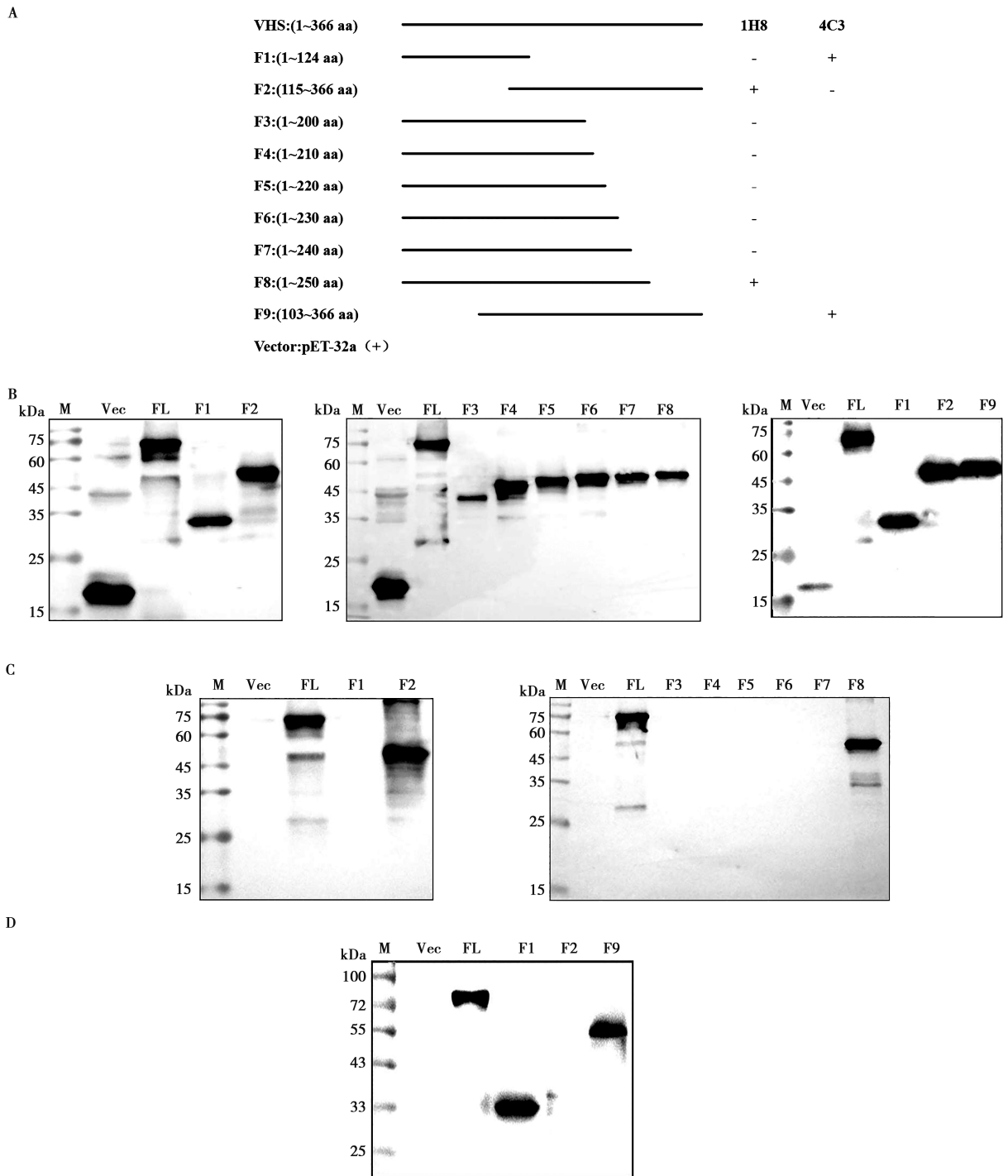


图 4 VHS 蛋白单克隆抗体与 PRV 的 IFA 反应性鉴定 (200×)

2.7 单克隆抗体的表位鉴定

根据 PRV ZJ01 毒株 VHS 基因序列设计了 9 条截短体引物 (图 5A), PCR 引物扩增 9 个 VHS 蛋白基因截短片段, Western blot 试验结果显示截短体均与 His 单克隆抗体反应, 截短片段长度与预期相符, 说明成功表达了目的蛋白 (图 5B)。进一步对 2 株单抗

的识别表位进行鉴定, 结果显示, 1H8 单克隆抗体识别表位位于 VHS 蛋白 241~250 aa 区域内 (图 5C), 氨基酸序列为²⁴¹VAPEDVKLKY²⁵⁰; 4C3 单克隆抗体识别表位位于 VHS 蛋白 103~114 aa 区域内 (图 5D), 氨基酸序列为¹⁰³RADGDGAADAPP¹¹⁴。



M. 蛋白质分子量 Marker; Vec. pET-32a 空载蛋白; FL. pET-32a-VHS; F1~F9. VHS 蛋白截短片段。
 A. VHS 蛋白截短体; B. Western blot 鉴定 (His 单抗为一抗); C. 1H8 单抗识别区域; D. 4C3 单抗识别区域。

图 5 PRV VHS 蛋白截短体构建策略及抗原表位鉴定

2.8 抗原表位空间结构分析

通过 Pyre2 网站对 PRV VHS 的三维结构进行预测, 使用 PyMol 软件将 2 个抗原表位位置映射到预测的结构模型上。如图 6 所示, 2 个抗原表位均分布于 VHS 蛋白的表面。

2.9 PRV VHS 蛋白抗原表位氨基酸位点比对

运用 BioEdit 软件对 47 种 PRV 毒株 VHS 蛋白的氨基酸序列进行分析, 结果如图 7 所示, 所鉴定出的抗原表位¹⁰³ RADGDGAADAPP¹¹⁴和²⁴¹ VAPEDVKLKY²⁵⁰在多种 PRV 毒株中有较高的保守性。

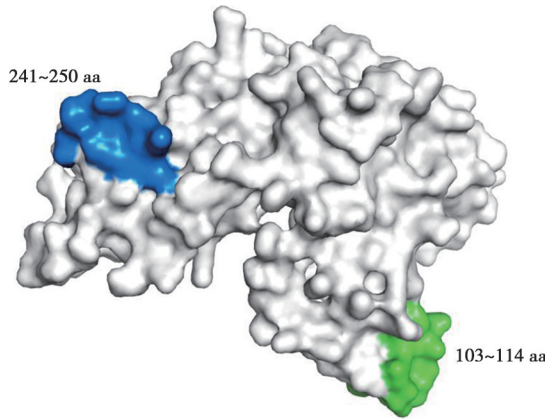


图 6 PRV VHS 蛋白的空间结构模型及抗原表位的分布

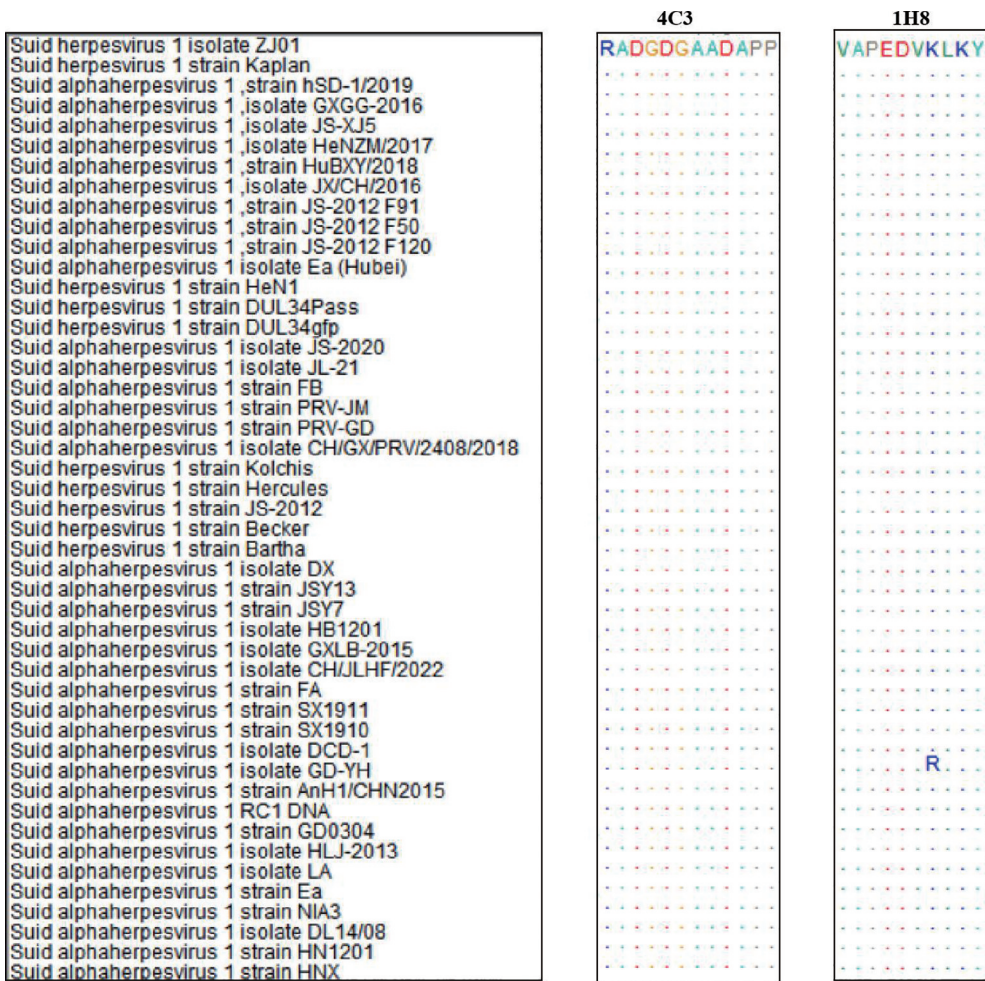


图 7 PRV VHS 蛋白抗原表位保守性分析

3 讨论

PRV 是危害我国养猪业发展的重要疾病之一。疫苗免疫是防治该疾病的最有效措施，但 2011 年底，我国许多猪场的 PRV 流行毒株出现了变异，毒力增强，抗原性也发生了变化^[13]，导致 Bartha-K61 弱疫苗保护率降低，无法产生完全保护^[14]，给我国针对

PR 的防控工作带来了新的挑战。因此，进一步研究 PRV 变异毒株致病机制十分重要，可以为控制该疾病提供新的策略。

PRV 和单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 同属于 α 疱疹病毒，而 HSV-1 作为目前研究最广泛的疱疹病毒之一，对其编码的 VHS 的研究也最深入和全面。HSV-1 VHS 蛋白由 UL41 基因编码，大小为

58 kDa^[15]。VHS 蛋白是一种核糖核酸酶，作为感染性病毒粒子的组成部分，VHS 蛋白进入宿主细胞后，会加速宿主细胞 mRNA 的降解，从而导致宿主蛋白的合成减少^[16]。VHS 还促进了属于所有 3 种时间类别（立即早期、早期和晚期）的病毒 mRNA 的周转，协助病毒蛋白合成的连续阶段之间的过渡^[17]。尽管 VHS 蛋白也破坏了病毒 mRNA 的稳定性，但 VP16 作为一种病毒转录因子，它直接与 VHS 蛋白结合并抑制其降解活性，从而在宿主 mRNA 被降解后，促使病毒 mRNA 得以积累^[18]。

PRV 与 HSV-1 的 VHS 蛋白在氨基酸序列上同源性仅为 41%，此外，HSV-1 VHS 氨基酸序列中的 113~164 aa 和 283~386 aa 区域不存在于 PRV VHS 中^[6]。尽管存在缺失区域，但 PRV VHS 蛋白携带了 VHS 蛋白中保守的大部分氨基酸，仍具有核糖核酸酶活性^[19]。已有研究表明，PRV VHS 是一种新的 IFN 拮抗蛋白。PRV VHS 通过抑制 NF- κ B 和阻断磷酸化的 IRF3 向细胞核移位，从而阻碍抗病毒因子的逃避^[20]。此外，PRV VHS 的 RNase 活性弱于 HSV VHS^[21]。目前关于 PRV VHS 的功能了解得不够全面，还需要做更深入的研究。

综上，本研究通过原核表达系统成功制备了 PRV VHS 重组蛋白，并利用该重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠，然后通过细胞融合、亚克隆技术以及间接 ELISA 筛选，最终得到 2 株单克隆抗体，皆能与 PRV 发生特异性反应。本研究鉴定出 PRV ZJ01 毒株 VHS 蛋白 2 个 B 细胞线性表位，分别位于 103~114 aa 和 241~250 aa，为研究 PRV VHS 蛋白结构与功能提供了重要材料。

参考文献：

- [1] POMERANZ L E, REYNOLDS A E, HENGARTNER C J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69 (3): 462-500.
- [2] ZHENG H H, FU P F, CHEN H Y, et al. Pseudorabies virus: from pathogenesis to prevention strategies [J]. *Viruses*, 2022, 14 (8): 1638.
- [3] YANG H, HAN H, WANG H, et al. A case of human viral encephalitis caused by pseudorabies virus infection in China [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 534.
- [4] KLUPP B G, HENGARTNER C J, METTENLEITER T C, et al. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome [J]. *J Virol*, 2004, 78 (1): 424-440.
- [5] ZHANG C J, LIU Y M, CHEN S S, et al. A gD&gC-substituted pseudorabies virus vaccine strain provides complete clinical protection and is helpful to prevent virus shedding against challenge by a chinese pseudorabies variant [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 2.
- [6] BERTHOMME H, JACQUEMONT B, EPSTEIN A. The pseudorabies virus host-shutoff homolog gene: nucleotide sequence and comparison with alpha herpesvirus protein counterparts [J]. *Virology*, 1993, 193 (2): 1028-1032.
- [7] LIU Y F, TSAI P Y, LIN F Y, et al. Roles of nucleic acid substrates and cofactors in the vhs protein activity of pseudorabies virus [J]. *Vet Res*, 2015, 46: 141.
- [8] LIU Y F, TSAI P Y, CHULAKASIAN S, et al. The pseudorabies virus vhs protein cleaves RNA containing an ires sequence [J]. *FEBS J*, 2016, 283 (5): 899-911.
- [9] LIN H W, HSU W L, CHANG Y Y, et al. Role of the UL41 protein of pseudorabies virus in host shutoff, pathogenesis and induction of TNF- α expression [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72 (9): 1179-1187.
- [10] 李科茫, 周金柱, 周俊明, 等. 猪 A 群轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备和初步鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55: 79-85.
- [11] 齐艳丽, 刘桃雪, 于海深, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54: 281-292.
- [12] 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: 111-115.
- [13] WANG C H, YUAN J, QIN H Y, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (27): 3379-3385.
- [14] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19 (11): 1749-1755.
- [15] 叶超. 伪狂犬病病毒遗传变异及 UL41 和 UL24 基因功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [16] SHEN G, WANG K, WANG S, et al. Herpes simplex virus 1 counteracts viperin via its virion host shutoff protein UL41 [J]. *J Virol*, 2014, 88 (20): 12163-12166.
- [17] KWONG A D, FRENKEL N. Herpes simplex virus-infected cells contain a function (s) that destabilizes both host and viral mRNAs [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1987, 84 (7): 1926-1930.
- [18] LAM Q, SMIBERT C A, KOOP K E, et al. Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function [J]. *EMBO J*, 1996, 15 (10): 2575-2581.
- [19] AMBAGALA A P N, GOPINATH R S, SRIKUMARAN S. Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its VHS activity [J]. *Virus Res*, 2003, 96 (1): 37-48.
- [20] YAN Z, YUE J, ZHANG Y, et al. Pseudorabies virus VHS protein abrogates interferon responses by blocking NF- κ B and IRF3 nuclear translocation [J]. *Virol Sin*, 2024, 39 (4): 587-599.
- [21] ELGADI M M, HAYES C E, SMILEY J R. The herpes simplex virus VHS protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts [J]. *J Virol*, 1999, 73 (9): 7153-7164.