

钟祖昌, 李本强, 陶洁, 等. 猪萨佩罗病毒 VP4 蛋白多克隆抗体制备及功能验证 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 78-84.

ZHONG Z C, LI B Q, TAO J, et al. Preparation of polyclonal antibody against porcine sapelovirus VP4 protein and its application [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 78-84.

猪萨佩罗病毒 VP4 蛋白多克隆抗体制备及功能验证

钟祖昌^{1,2#}, 李本强^{2,3#}, 陶洁^{2,3}, 程靖华^{2,3}, 石迎^{2,3},
刘佩红^{2,3}, 唐攀^{2,3}, 焦嘉杰^{2,3}, 刘惠莉^{2,3*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所/上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

3. 上海市种猪工程技术中心, 上海 201106)

摘要: 为深入揭示猪萨佩罗病毒 (porcine sapelovirus, PSV) 致病机制, 以毒株 SHCM2019 为研究对象, 原核表达 VP4 蛋白并制备多克隆抗体。根据 VP4 氨基酸序列进行 PSV 遗传进化分析, 然后将 VP4 基因与原核表达载体连接, 经诱导表达得到可溶性 VP4 蛋白。纯化后的 VP4 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 制备多克隆抗体并进行 ELISA、Western blot、间接免疫荧光试验 (IFA) 验证其反应性。ELISA 结果显示, 多克隆抗体效价达 1 : 128 000; Western blot 和 IFA 结果表明, 其能特异性识别和结合 PSV, 说明重组 VP4 蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。本研究成功表达了 VP4 蛋白并制备了多克隆抗体, 为 VP4 蛋白功能研究奠定基础。

关键词: 猪萨佩罗病毒; VP4 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.651 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)04-0078-07

Preparation of polyclonal antibody against porcine sapelovirus VP4 protein and its application

ZHONG Zuchang^{1,2#}, LI Benqiang^{2,3#}, TAO Jie^{2,3}, CHENG Jinghua^{2,3}, SHI Ying^{2,3},
LIU Peihong^{2,3}, TANG Pan^{2,3}, JIAO Jiajie^{2,3}, LIU Huili^{2,3*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences/
Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding,
Shanghai 201106, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Shanghai 201106, China)

Abstract: In order to investigate porcine sapelovirus (PSV) in depth, this study utilized the SHCM2019 strain to prepare VP4 protein and its polyclonal antibodies through prokaryotic expression. Genetic evolutionary analysis was conducted based on the amino acid sequence of VP4. Then, the VP4 gene was ligated into the prokaryotic expression vector pET-N-GST-Precision and transformed. Induced expression resulted in soluble VP4 protein. Next, BALB/c mice were immunized with the purified VP4 protein to prepare polyclonal antibodies, which were subsequently validated for their reactivity using ELISA, Western blot, and IFA assays. The ELISA results revealed that the polyclonal antibody titre reached 1 : 128 000, demonstrating high specificity. The Western blot and IFA results indicated that the antibody could specifically recognize and bind to PSV, suggesting that the recombinant VP4 protein possessed good immunogenicity and reactivity. This study successfully expressed the VP4 protein with a GST tag and produced polyclonal antibodies, laying the groundwork for future research on the function and applications of the VP4 gene.

Keywords: porcine sapelovirus; VP4 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

收稿日期: 2024-04-13; 修回日期: 2025-02-12

基金项目: 上海市农业科技创新项目 (2023-02-08-00-12-F04612); 上海市农业科学院动物疾病防控卓越团项目 (沪农科卓 [2022] 012)

第一作者: 钟祖昌, 男, 硕士研究生; 李本强, 男, 副研究员。*共同第一作者

*通信作者: 刘惠莉, 研究员, 主要从事动物传染病防治和诊断技术方面的研究, E-mail: huilil@163.com。

猪萨佩罗病毒 (porcine sapelovirus, PSV) 是一种表面无囊膜包被的 RNA 病毒, 属于微 RNA 病毒科萨佩罗病毒属^[1], 20 世纪 60 年代, 由英国科学家首次从腹泻猪的肠道中分离得到, 故又被称为猪肠道病毒 8 型 (porcine enterovirus 8, PEV8)^[2]。之后其他国家也报道了 PSV 相关研究^[3-7]。PSV 主要通过粪-口途径传播, 猪感染后会严重腹泻和繁殖障碍综合征, 同时还存在亚临床症状^[8]。随着养猪产业规模化和区域化, 对于类似 PSV 感染的防控应更加重视, 避免给养猪业造成无法估计的经济损失。

PSV 基因组大小约 7.5 kb, 由 5' 非编码区、开放阅读框、3' 非编码区和 Poly A 尾组成, 开放阅读框被 2A、3C 及 3D 蛋白酶所裂解, 产生三大区域 P1、P2 和 P3。P1 包含 4 个结构蛋白, 即 VP4、VP2、VP3 和 VP1, P2 和 P3 分别包含 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 共 7 个非结构蛋白^[9]。VP4、VP1、VP2 和 VP3 组成衣壳蛋白, 而 VP4 位于内部^[10]。VP4 基因大小为 159 bp, 编码 53 个氨基酸, 蛋白质大小约为 6 kDa。对人鼻病毒 (human rhinovirus, HRV) 研究发现, 在病毒进入细胞期间, 豆蔻酰化的衣壳蛋白 VP4 从病毒中释放出来, 与细胞膜相互作用, 参与将病毒 RNA 基因组递送到细胞质中启动复制^[11]。可见, 研究 VP4 蛋白的功能对于揭示 PSV 的致病机制具有重要意义。本研究构建了带有 GST 标签的 VP4 重组质粒, 表达和纯化 VP4 重组蛋白, 并成功制备了小鼠多克隆抗体, 为 PSV 的临床检测和致病机理

研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、载体及菌株

PSV 毒株 SHCM2019 (GenBank 登录号: MN685785.1) 由本实验室分离保存, pET-N-GST-Precision 质粒购于碧云天生物公司, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 由本实验室保存。

1.2 主要细胞、实验动物和主要试剂

猪肾细胞 (PK15) 由本实验室保存。6 周龄 BALB/c 小鼠购于上海思捷实验动物有限公司。反转录试剂盒、核酸 Marker、T4 DNA 连接酶及缓冲液购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Sal* I 购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒和质粒小提取试剂盒购自天根生物公司; IPTG 购于美国 Biovision 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、DAPI 染色液及谷甘光肽填料购于碧云天生物公司; 弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 遗传进化分析

GenBank 下载国内外代表性毒株 VP4 蛋白序列, 与本实验分离得到的毒株 SHCM2019 (GenBank 登录号: MN685785.1) 进行分子发生树分析。利用 MEGA X 软件进行多序列比对, 根据比对结果, 采用 NJ 法进行系统发育树构建, Bootstraps 值设置为 1 000, 成对删除。各毒株详细信息见表 1。

表 1 PSV 毒株信息

序列	毒株名称	GenBank 登录号	分离地	时间
1	PSV/IND/TN-400-tc-/2016	MN241820.1	印度	2016
2	Jpsv447	LC326556.1	日本	2009
3	JXXY-C	MH626635.1	中国	2017
4	USA/IA33375/2015	KX574284.1	美国	2015
5	PSV/IND/WB-76-tc/2018	MN241819.1	印度	2018
6	Jpsy1315	LC326555.1	日本	2009
7	KS055217	KJ821021.1	韩国	2005
8	HaN01-CH2019	MT080999.1	中国	2019
9	PSV-C	MG732814.1	中国	2016
10	KS05151	KJ821020.1	韩国	2005
11	SHCM2019	MN685785.1	中国	2019
12	YC2011	JX286666.1	中国	2011
13	KS04105	KJ821019.1	韩国	2004
14	PSV-A2	MG732813.1	中国	2016
15	JXXY-a2	MH626634.1	中国	2017
16	JD2011	KF539414.1	中国	2011

续表1

序列	毒株名称	GenBank 登录号	分离地	时间
17	HNNY-04/CHN/2018	MN755860.1	中国	2018
18	XTND/2018	LC493088.1	越南	2018
19	V13	NC_003987.1	美国	2002
20	IVRI/PSV/SPF/C-6/2015	KY053835.1	印度	2015
21	SwPSV75B02012	MN836683.1	意大利	2012
22	DIAPD5469-10	MK497044.1	意大利	2015
23	SZ1M-F/PSV/HUN/2013"	MN807752.1	匈牙利	2013
24	NGR_2017_NHP_SV	MN784122.1	尼日利亚	2017

1.4 引物设计与合成

参照 PSV SHCM2019 毒株序列，针对 VP4 基因

设计特异性引物 1 对，由生工生物公司合成，详见表 2。

表 2 引物信息

引物名称	序列 (5'→3')	片段大小/bp	内切酶
VP4-F	<u>CGGAATTC</u> GGTGCTTACAACCATGGCTC	159	<i>EcoR</i> I
VP4-R	CGGTCGAC <u>CTTCAATGATG</u> TCCAGCCA		<i>Sal</i> I

注：下划线为酶切位点。

1.5 重组质粒 pET-N-GST-VP4 的构建和鉴定

使用 RNA 提取试剂盒提取 PSV 毒株 SHCM2019 的 RNA，以其为模板，反转录为 cDNA，经 RT-PCR 扩增。切胶后回收，再经双酶切后与同样酶切的 pET-N-GST-Precission 原核表达过夜载体连接，连接后转化，单菌落经 PCR 鉴定后，送至铂尚生物技术（上海）有限公司进行测序，同时提质粒进行酶切验证，将阳性质粒命名为 pET-N-GST-VP4。

1.6 VP4 重组蛋白的诱导表达和可溶性条件优化

将过夜培养的阳性菌液按 1 : 100 接种量加到含有 50 μg/mL 卡那霉素 LB 培养基中，于 37 °C 摇床培养，直至菌液 OD_{600} 值达到 0.5~0.7 时，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达，在继续培养 6 h 之后，对菌液进行收集。随后，通过超声破碎处理，将菌体破碎并分离出上清液和沉淀物。同时为了增加 GST-VP4 重组蛋白的可溶性，进行了可溶性蛋白诱导表达条件优化。在同一 0.5 mmol/L IPTG 浓度下，分别设置 30、25、20 和 16 °C 共 4 个温度梯度，进行诱导表达 12 h 后取样，用 1 mL 预冷的 PBS 重悬菌体后，于超声破碎仪中破碎菌体。破碎结束后于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min，将上清液和沉淀分离开，并进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 VP4 重组蛋白的纯化

收集诱导表达的菌体（总体积 400 mL）后，用预冷的 PBS 重悬菌体，洗涤 3 次后，加入洗涤缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH =

8.0）重悬，随后置于冰上超声破碎 10 min（超声 4 s，停 6 s），结束后于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。将上清液加入平衡好的 GST 标签纯化树脂中，置于 4 °C 摇床上结合 3 h 后，将其加到纯化柱中，用 3 倍柱体积的洗涤缓冲液洗涤填料，再用 2 倍柱体积的洗脱缓冲液（10 mmol/L 谷胱甘肽，50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH = 8.0）洗脱蛋白。用超滤离心管对纯化的重组蛋白 VP4 进行蛋白浓缩和脱盐，测定蛋白浓度，分装后于 -80 °C 冻存。

1.8 多克隆抗体制备

每只小鼠免疫剂量为 50 μg，将弗氏完全佐剂与纯化的 VP4 重组蛋白按 1 : 1 比例混合，乳化后采用皮下及肌肉注射方式免疫小鼠。首次免疫 2 周后，每隔 1 周进行二免及三免（采用弗氏不完全佐剂）。三免结束，断尾采血并分离血清，置于 -40 °C 保存。

1.9 抗体效价检测

纯化后的重组蛋白 VP4 以碳酸盐缓冲液稀释至 2 μg/mL，每孔 100 μL，4 °C 包被过夜；次日，经 PBST 洗涤 5 次后，每孔加入 200 μL 的 5% 脱脂奶粉，37 °C 恒温箱中封闭 2 h；PBST 洗涤 5 次后，将获得的小鼠血清用 PBST 稀释，由 1 : 1 000 倍比稀释至 1 : 256 000，免前血清作为阴性对照，每孔 100 μL，37 °C 孵育 1.5 h；PBST 洗涤 5 次后，HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H + L) 作为二抗，用 PBST 以 1 : 20 000 进行稀释，每孔 100 μL，37 °C 孵育

30 min; PBST 洗涤 5 次后, 每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液显色; 最后加入 100 μL 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 并使用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值。

1.10 多克隆血清抗体特异性检测

将纯化的 VP4 蛋白稀释至 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; PBST 洗涤 4 次后, 每孔加入 200 μL 的 5% 脱脂奶粉, 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h; PBST 洗涤 5 次后, 将获得的 VP4 多克隆抗体以及作为阴性对照的其他病毒阳性血清, 如猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、口蹄疫病毒 (FMDV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPV)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 等血清及健康猪阴性血清, 用 PBST 按 1 : 1 000 稀释, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h; PBST 洗涤 5 次后, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和 HRP 标记的山羊抗猪 IgG (H+L) 作为二抗, 用 PBST 以 1 : 20 000 进行稀释, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; PBST 洗涤 5 次后, 加入 100 μL 的 TMB 显色液 (AB 液混合), 显色 10 min; 最后加入 100 μL 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 并使用酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.11 多克隆抗体的 Western blot 分析

纯化的重组蛋白 VP4 进行 SDS-PAGE, 采用湿转法转印至 NC 膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 30 min; 随后 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, VP4 多克隆抗体

(1 : 2 000 稀释) 作为一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 洗涤后以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (H+L) (1 : 10 000 稀释) 作为二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤后用化学发光 HRP 底物显色液进行显色, 利用化学发光成像系统进行成像。

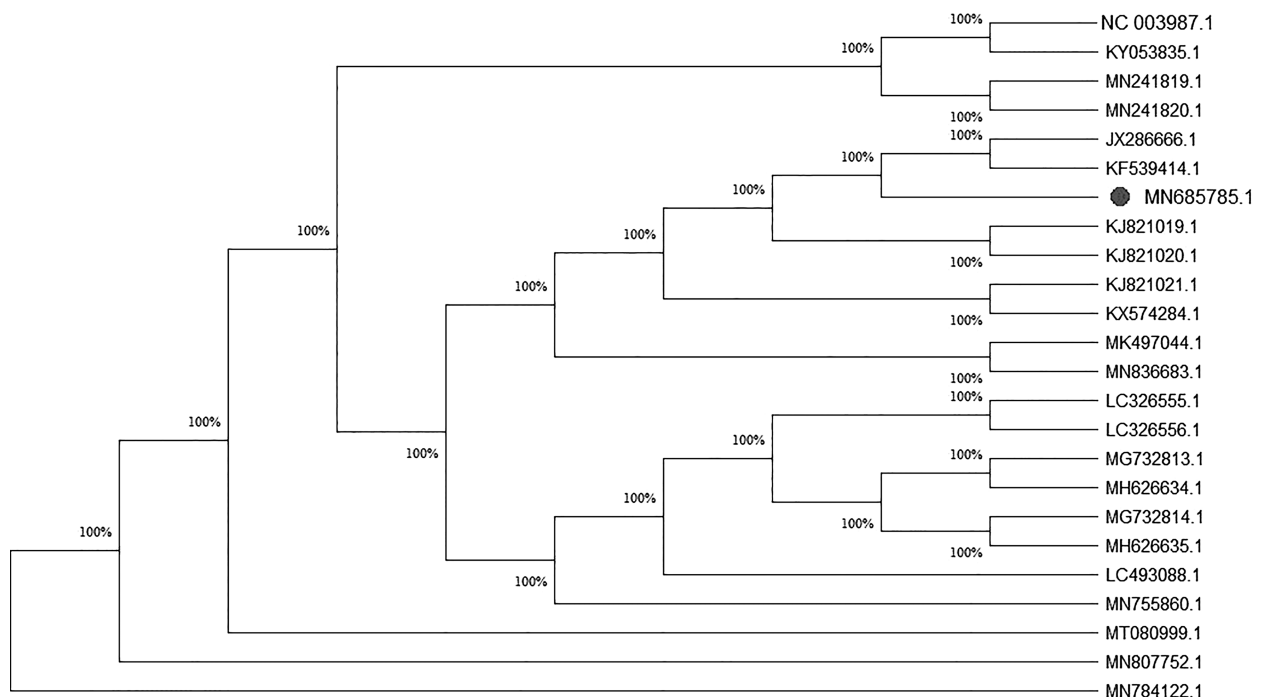
1.12 多克隆抗体的间接免疫荧光 (IFA) 验证

将 PK-15 细胞均匀铺在 24 孔细胞板上, 当细胞生长至 80% 时, 使用感染比 (MOI) 为 0.1 的 PSV 接种细胞。感染细胞后 48 h, 将细胞培养基倒掉, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。用 PBS 洗涤 5 次, 使用 1% Triton X-100 室温处理细胞 10 min。接着用 PBS 洗涤 5 次, 使用 PBS 稀释 (1 : 1 000) 后 VP4 多克隆抗体、免前小鼠血清作为一抗加入细胞板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBS 洗涤 5 次, 加入用 PBS 稀释 (1 : 1 000) 的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。最后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 染细胞核 5 min 后, 于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 遗传进化分析

利用 Mega X 软件对毒株 SCHM2019 的 VP4 蛋白序列和国内外其他代表毒株进行遗传进化分析。结果表明, 这些毒株的 VP4 蛋白序列高度相似 (100%), 说明 VP4 蛋白是一个高度保守的蛋白 (图 1)。



注: ●为本试验毒株。

图 1 基于 VP4 蛋白序列构建系统进化树

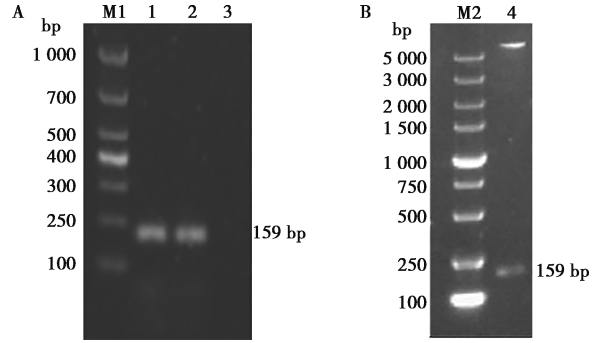
2.2 重组表达载体构建与鉴定

以 PSV SHCM2019 毒株的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，获得大小约 159 bp 条带的 VP4 基因（图 2A）。将其克隆至 pET-N-GST-Precision 载体中，构建重组质粒 pET-N-GST-VP4。双酶切重组质粒进行鉴定，同时将阳性重组质粒进行测序，测序结果与目的序列一致（图 2B）。

2.3 重组蛋白 VP4 的诱导表达及可溶性优化

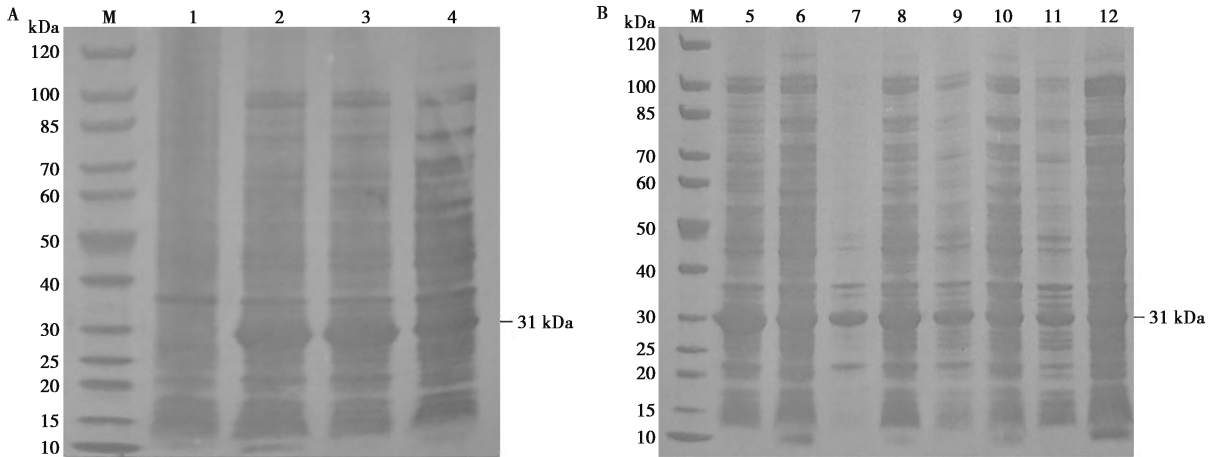
对诱导表达后分离得到的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果显示，表达的蛋白约为 31 kDa，与预测结果一致，且表达的 VP4 蛋白主要以包涵体的形式存在（图 3A），但也有部分可溶。为了增加重组蛋白 VP4 的水溶性，进行了可溶性蛋白诱导表达及条件优化，结果显示，在 25 °C、20 °C 及 16 °C 诱导 12 h 后可溶性的 GST-VP4 蛋白获得了

显著性提高，其中在 25 °C、0.5 mmol/L IPTG、诱导 12 h 条件下，可溶性表达效果最明显（图 3B）。



M1. DL1000 DNA Marker; 1~2. VP4 基因; 3. 阴性对照; M2. DL5000 DNA Marker; 4. pET-N-GST-VP4 的酶切鉴定。

图 2 VP4 基因的 PCR 扩增 (A) 及双酶切鉴定 (B)



M. 蛋白 Marker; 1. 诱导前全菌; 2. 诱导产物; 3. 诱导后沉淀; 4. 诱导后上清液; 5、6. VP4 经 30 °C 诱导后沉淀和上清液; 7、8. 25 °C 诱导后沉淀和上清液; 9、10. 20 °C 诱导后沉淀和上清液; 11、12. 16 °C 诱导后沉淀和上清液。

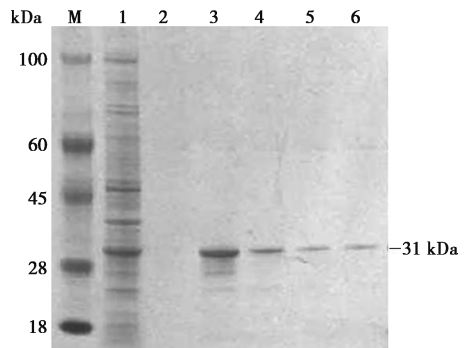
图 3 重组蛋白 VP4 诱导表达产物 (A) 及诱导表达条件优化 (B)

2.4 重组蛋白 VP4 的纯化

在最佳条件下大量诱导表达，对收集的菌体进行超声波破碎并收集上清液。利用 GST 亲和层析技术对上清液中的蛋白进行纯化（见图 4）。使用超滤离心管脱盐和浓缩后，经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得蛋白浓度约为 852 μg/mL。

2.5 抗体效价及特异性分析

采集小鼠三免后的血清，利用 ELISA 检测抗体效价。结果显示，VP4 多克隆抗体效价能达到 1 : 128 000（图 5A）。经特异性检测发现，仅 VP4 多克隆抗体呈阳性，说明 VP4 蛋白特异性强（图 5B）。



M. 蛋白 Marker; 1. 流穿液; 2. 裂解缓冲液洗涤; 3~6. 10 mmol/L 谷胱甘肽洗涤。

图 4 重组蛋白 VP4 的纯化

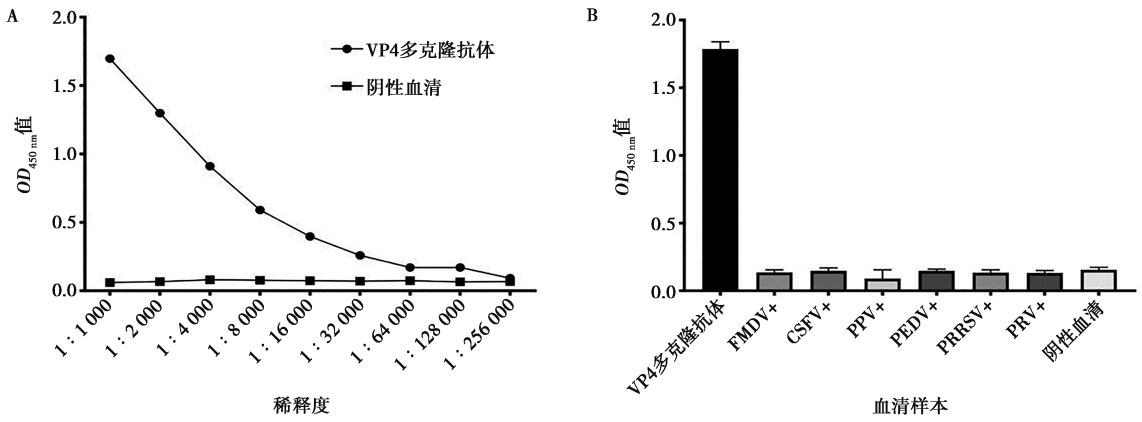


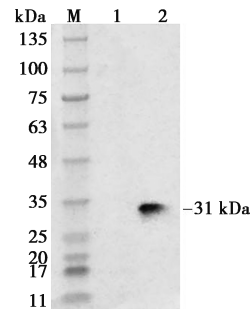
图5 VP4多克隆抗体的效价测定(A)及特异性分析(B)

2.6 Western blot 鉴定

重组蛋白VP4经SDS-PAGE后,以制备的VP4多克隆抗体作为一抗进行Western blot检测,结果显示,有一条约31 kDa的特异性条带,说明VP4多克隆抗体可特异性识别重组VP4蛋白(图6)。

2.7 IFA 鉴定多克隆抗体

将PSV感染PK-15细胞48 h后,用制备的VP4蛋白多克隆抗体进行IFA,结果显示,制备的VP4多克隆抗体能与感染细胞发生反应,出现荧光,说明制备的VP4多克隆抗体能与PSV毒株发生特异性结合(图7)。



M. 蛋白Marker; 1. pET-N-GST-Precision 空载; 2. 纯化的VP4重组蛋白。

图6 Western blot 鉴定

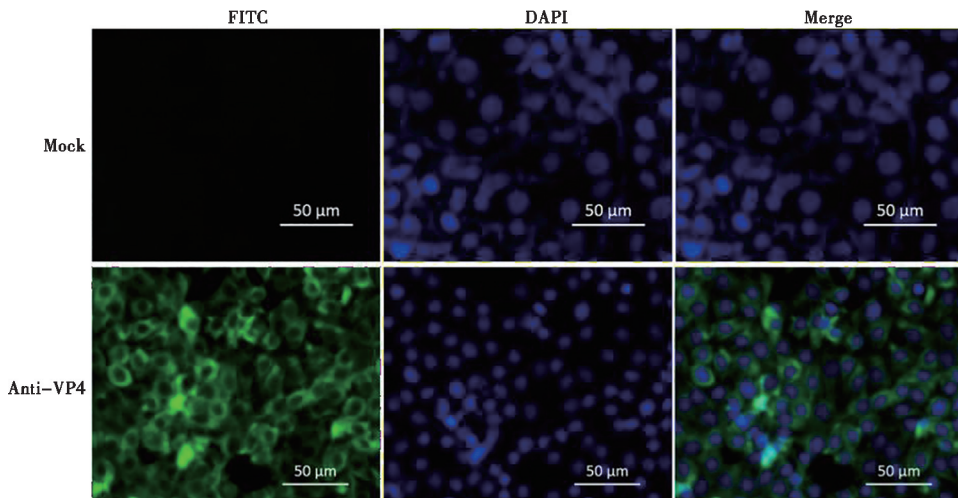


图7 VP4多克隆抗体的IFA分析

3 讨论

PSV作为一种肠道病毒,感染猪后可引起腹泻,中后期甚至会导致死亡,还会引起猪的多种病症。母猪感染PSV后,易发生流产和产死胎等繁殖障碍性疾病,还存在肺炎和脑脊髓灰质炎等症状^[12-13]。PSV与其他病原体共感染,不仅会形成不同的病理特征,还会干扰诊断和防控。目前对PSV感染的致

病性和致病机制尚不完全清楚,阻碍了疾病的防控。随着PSV的危害性逐渐被认识,越来越多的学者开始对其展开研究。在检测方法方面,由于VP1是PSV的主要免疫原性蛋白,发挥着重要的抗原效应,孔祥雨等^[12]、李娜娜等^[13]、郝晨琳^[14]原核表达VP1重组蛋白,并制备了PSV VP1多克隆抗体,建立ELISA方法用于PSV的检测;孙杰等^[15]原核表达PSV的非结构蛋白3C,并以3C蛋白为抗原,建

立 ELISA 用于检测 PSV。在致病机制方面, Mou 等^[16]研究发现, PSV 感染后可诱导细胞凋亡(核固缩和碎裂), 2A 蛋白是诱导线粒体凋亡途径的重要因子; Yin 等^[17]研究发现, PSV 对 I 型干扰素(IFN- β)敏感, 通过病毒 3C 蛋白抑制 IFN- β 的产生, 同时 3C 蛋白通过其蛋白酶活性降解黑色素瘤分化相关基因 5 (MDA5) 和 TANK 结合激酶 1 (TBK1), 并通过 caspase 途径切割线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS)。

对微 RNA 病毒科的其他病毒研究发现, 病毒感染期间, 无囊膜病毒无法通过膜融合的方式进入细胞并复制其基因组。HRV^[11,18]、肠道病毒^[20]、脊髓灰质炎病毒^[20-21]等都含有一种被称为 VP4 的衣壳蛋白, 其位于病毒粒子表面的最内部, 是最小的蛋白, 约 5 kDa。当病毒感染细胞时, VP4 蛋白 N 端豆蔻酰化, 改变细胞膜通透性, 形成离子通道, 释放病毒 RNA 进入细胞。因此, VP4 蛋白是一种潜在的抗病毒靶点, 可用于抗病毒药物的研发。Ramsingh 等^[22]对柯萨奇病毒 B4 型 VP4 蛋白序列进行点突变, 丧失豆蔻酰化能力, 结果表明点突变的 VP4 蛋白使得病毒的毒力降低, 病毒对细胞的感染力下降, 这与 Cao 等^[19]对肠道病毒 71 的研究结果相一致。由此可见, VP4 蛋白可能在 PSV 入侵细胞过程中很重要。

本研究中, 表达的 VP4 重组蛋白为可溶性且高度保守, 可应用于后续 PSV 检测方法的建立。另外, VP4 蛋白制备的抗体效价达 1:128 000, 且不与其他病原血清发生反应, IFA 证实该抗体能识别并结合 PSV, Western blot 证实该抗体能特异性识别 VP4 蛋白, 表明制备的多克隆抗体可用于深入研究 VP4 蛋白与宿主细胞的互作。

综上, 本研究成功表达了 VP4 重组蛋白, 并制备了具有良好抗原特异性的 VP4 多克隆抗体, 为 PSV 感染的临床诊断和致病机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] OBERSTE M S, MAHER K, PALLANSCH M A. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76: 1244-1251.
- [2] KAKU Y, SARAI A, MURAKAMI Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses [J]. *The Journal of General Virology*, 2001, 82 (2): 417-424.
- [3] LAN D, JI W, YANG S, et al. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain [J]. *Arch Virol*, 2011, 156: 1567-1574.
- [4] DONIN D G, DE ARRUDA LEME R, ALFIERI A F, et al. First report of *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) in pig herds of Brazil [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2014, 46: 523-528.
- [5] PIORKOWSKI G, CAPAI L, FALCHI A, et al. First identification and genomic characterization of a porcine sapelovirus from Corsica, France, 2017 [J]. *Microbiol Resour Announc*, 2018, 7 (11): e01049-18.
- [6] RAY P K, DESINGU P A, KUMARI S, et al. Porcine sapelovirus among diarrhoeic piglets in India [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (1): 261-263.
- [7] SUNAGA F, MASUDA T, ITO M, et al. Complete genomic analysis and molecular characterization of Japanese porcine sapeloviruses [J]. *Virus Genes*, 2019, 55: 198-208.
- [8] SCHOCK A, GURRALA R, FULLER H, et al. Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom [J]. *Veterinary microbiology*, 2014, 172 (3/4): 381-389.
- [9] LAWSON M A, SEMLER B L. Picornavirus protein processing: enzymes, substrates, and genetic regulation [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, 161: 49-87.
- [10] ACHARYA R, FRY E, STUART D, et al. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution [J]. *Nature*, 1989, 337: 709-716.
- [11] PANJWANI A, STRAUSS M, GOLD S, et al. Capsid protein VP4 of human rhinovirus induces membrane permeability by the formation of a size-selective multimeric pore [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004294.
- [12] 孔祥雨, 曹丽艳, 索学鹏, 等. 猪萨佩罗病毒 VP1 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53 (3): 339-345.
- [13] 李娜娜, 陶洁, 李本强, 等. 猪萨佩罗病毒 VP1 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51 (4): 435-440.
- [14] 郝晨琳. 猪萨佩罗病毒 VP1 蛋白单克隆抗体制备及阻断 ELISA 抗体检测方法的建立 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [15] 孙杰, 朱琳, 焦点, 等. 猪萨佩罗病毒 3C 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40: 697-701.
- [16] MOU C, WANG Y, PAN S, et al. Porcine sapelovirus 2A protein induces mitochondrial dependent apoptosis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1050354.
- [17] YIN M, WEN W, WANG H, et al. Porcine sapelovirus 3C^{pro} inhibits the production of type I interferon [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 852473.
- [18] DAVIS M P, BOTTLEY G, BEALES L P, et al. Recombinant VP4 of human rhinovirus induces permeability in model membranes [J]. *J Virol*, 2008, 82: 4169-4174.
- [19] CAO J, QU M, LIU H, et al. Myristoylation of EV71 VP4 is essential for infectivity and interaction with membrane structure [J]. *Viral Sin*, 2020, 35: 599-613.
- [20] DANTHI P, TOSTESON M, LI Q H, et al. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus [J]. *J Virol*, 2003, 77: 5266-5274.
- [21] CHOW M, NEWMAN J F, FILMAN D, et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance [J]. *Nature*, 1987, 327: 482-486.
- [22] RAMSINGH A I, COLLINS D N. A point mutation in the VP4 coding sequence of coxsackievirus B4 influences virulence [J]. *J Virol*, 1995, 69: 7278-7281.