

毛玘懿, 孙波涛, 戴琦, 等. 猪 A 群轮状病毒 VP4 单克隆抗体的制备和初步鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 77-82.

MAO D Y, SUN B T, DAI Q, et al. Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against VP4 of porcine rotavirus A [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 77-82.

## 猪 A 群轮状病毒 VP4 单克隆抗体的制备和初步鉴定

毛玘懿<sup>1</sup>, 孙波涛<sup>1</sup>, 戴琦<sup>1</sup>, 李文良<sup>2</sup>, 李梅珍<sup>1</sup>, 陈艳<sup>1</sup>,  
赵冰倩<sup>1</sup>, 陈婧<sup>1</sup>, 周斌<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;  
2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 旨在制备一种特异性强、灵敏度高的猪 A 群轮状病毒 (porcine rotavirus A, PoRVA) VP4 单克隆抗体。本研究通过 PCR 扩增 PoRVA 分离株 VP4 基因的完整片段 (2 463 bp), 构建原核表达载体 pET-28a-VP4 表达蛋白后制备单克隆抗体并进行鉴定。结果: 重组蛋白大小在 98 kDa 左右, 为不可溶蛋白, 存在于包涵体中; 经验证, 猪轮状病毒阳性血清能够识别该重组蛋白, 蛋白条带单一且清晰, 具备良好的抗原性; 蛋白纯化后, 经小鼠免疫流程以及细胞融合筛选, 3 轮亚克隆后最终获得 1 株能稳定分泌抗 VP4 蛋白的阳性杂交瘤细胞株 4B10, 其轻链类型为 Kappa 型, 重链亚型为 IgG1, 制备的小鼠腹水效价可达 1 : 3 000 000; 在此基础上制备的单克隆抗体能特异性识别 PoRV Pig/NJ/2012, 具有良好反应性, 可用于靶抗原的直接检测。综上, 本研究制备的单克隆抗体特异性强、灵敏度高, 为后续蛋白功能及病毒致病机制的研究提供了生物材料。

**关键词:** 猪 A 群轮状病毒; 单克隆抗体; VP4 蛋白

中图分类号: S852.659 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)06-0077-06

## Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against VP4 of porcine rotavirus A

MAO Dingyi<sup>1</sup>, SUN Botao<sup>1</sup>, DAI Qi<sup>1</sup>, LI Wenliang<sup>2</sup>, LI Meizhen<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>,  
ZHAO Bingqian<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** This study aimed to prepare a monoclonal antibody against the VP4 protein of porcine rotavirus A (PoRVA) with strong specificity and high sensitivity. In here, the VP4 gene (2 463 bp) of PoRVA was amplified by PCR, and prokaryotic expression vector pET-28a-VP4 was constructed to express the protein. Finally, monoclonal antibodies were prepared to identify it. The results showed that the recombinant protein was about 98 kDa, was insoluble and existed in the inclusion bodies. The His-tagged antibody and PoRV positive serum could recognize the recombinant protein. The band was single and clear, and the protein had good antigenicity. After protein purification, the mouse immune cell fusion filtering process, and three rounds of cloning, a positive hybridoma cell line 4B10 was finally obtained which was able to steadily produce monoclonal antibodies against VP4 proteins. The light chain type of the strain was Kappa, its heavy chain subtype was of IgG1, and its titer of mouse ascites preparation was 1 : 3 000 000. On this basis, the monoclonal antibody prepared was able to specifically recognize PoRV Pig/NJ/2012 with good reactivity, and can be used for direct detection of target antigens; which provided a biological material for subsequent application of monoclonal antibodies. In conclusion, the monoclonal antibody prepared in this study had strong specificity and high sensitivity, providing biological materials for future research on the protein function and the pathogenic mechanism of the virus.

**Keywords:** porcine rotavirus A; monoclonal antibody; VP4 protein

收稿日期: 2024-05-22; 修回日期: 2025-04-23

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1801300)

第一作者: 毛玘懿, 女, 硕士研究生。

\* 通信作者: 周斌, 教授, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学, 动物疫病诊断与防控, E-mail: zhoubin@njau.edu.cn.

猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 主要引起 8 周龄以下仔猪急性腹泻, 猪感染该病毒后具有高发病率和死亡率, 其感染引起的病变主要局限于消化道, 如胃壁松弛、充满凝乳、小肠黏膜呈条状或弥漫性出血<sup>[1]</sup>。PoRV 经消化道进入肠道后, 在小肠绒毛上皮细胞的细胞质中进行复制<sup>[2]</sup>。PoRV 可引起小肠绒毛细胞溶解脱落, 改变细胞膜通透性, 损害黏膜屏障的结构和功能。而其中猪 A 群轮状病毒 (porcine rotavirus A, PoRVA) 常导致腹泻 (猪的常见疾病), 与之相关的脱水是导致猪只死亡的主要原因, 这给养猪业造成了相当大的经济损失。VP4 是 PoRV 的外壳蛋白, 在感染过程中负责受体附着的部分。VP4 蛋白也是一种潜在的抗 PoRV 感染的疫苗免疫原, 因为它可以诱导动物机体产生特异性中和抗体, 在仔猪中产生全身免疫<sup>[3-4]</sup>。VP4 蛋白在病毒的入侵过程中主要负责识别, 能够决定病毒的毒力大小。机体感染病毒后, VP4 蛋白与宿主细胞互相发生一定的作用, 相关蛋白酶水解切割 VP4 产生 VP5 和 VP8, 病毒通过这种自主拆分的形式增强感染能力<sup>[5-6]</sup>。VP5 穿过细胞囊泡膜的脂质双分子层, 之后细胞膜的通透性增加, 病毒更容易进入到细胞内部<sup>[7]</sup>; VP8 能够黏附细胞, 对小肠上皮细胞进行一定程度的破坏, 小肠绒毛继而变短, 变得疏松, 机体发生病理性改变<sup>[8]</sup>。

目前对 PoRV 感染没有有效的治疗方法, 接种疫苗是控制的主要方法<sup>[9]</sup>。抗 PoRV 单克隆抗体的研制有助于加速解析病毒蛋白的结构与功能, 探究病毒与宿主的相互作用和病毒的免疫逃避机制, 从而更高效地筛选出抗病毒药物, 有针对性地开发疫苗, 同时为建立高特异、高灵敏性的血清学诊断方法提供材料<sup>[10-11]</sup>。

本研究将 PoRVA/Porcine-tc/KOR/174-1/2006/G8P7 (GenBank: MF940547.1) 毒株的 VP4 全长序列插入到 pET-28a (+) 载体, 通过原核表达系统摸索出合适的表达条件, 在超滤纯化后获得较高浓度和高纯度的 PoRV 重组 VP4 蛋白, 应用杂交瘤技术制备出 1 株针对 VP4 蛋白的单克隆抗体, 为 PoRV 诊断方法开发及病原学基础研究提供了一定的生物学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

PoRV/G9P [7] /2023 株由本实验室自行分离并鉴定, PoRV Pig/NJ/2012 感染细胞裂解样品由江苏省农业科学院兽医研究所李彬研究员馈赠。MA104 细胞、小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 和原核表达载体 pET-28a (+) 由本实验室保存。SPF 级 BALB/c 小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司, 小鼠在南京农

业大学实验动物中心饲养, 免疫程序等参照实验动物操作标准, 实验动物福利与伦理审核编号为 NJAU. No20220706145。

GreenTaq Mix、高保真 PCR 聚合酶 PrimeSTAR、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、DNA Marker、10× 核酸 Loading Buffer、T4 DNA 连接酶和 DNA 胶回收试剂盒均购自宝日生物技术有限公司 (北京) 有限公司, 质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  与 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司。

180 kDa 预染 Protein Marker、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒均购自南京诺唯赞医疗科技有限公司, 250 kDa 三色预染蛋白 Marker、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 50 kDa 超滤管购自默克旗下子公司 Millipore, 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜 (IPVH00010) 购自 Merck 公司, PoRV 阳性血清样本 (G12P [7] 型, 1:1 000 稀释使用) 由新希望六合有限公司馈赠。

HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体、His 单克隆抗体、鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂盒均购自 Proteintech 公司, HRP 标记山羊抗猪 IgG 购自 Abcam 公司, TMB 底物、终止液均购自碧云天生物技术有限公司, 96 孔 ELISA 板购自无锡耐思生命科技股份有限公司, DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司, 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG4000、HAT 和 HT 培养基均购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 pET28a (+) -VP4 重组质粒的构建

在 GenBank 里查找 RVA/Porcine-tc/KOR/174-1/2006/G8P [7] 株 (编号 MF940547.1) 的 VP4 全长基因序列, 经蛋白质跨膜区预测在线工具 TMHMM-2.0 分析, 该序列不含跨膜区, 可全长表达。

选择卡那霉素抗性的 pET-28a (+) 作为空载, 使用 Snapgene 生物分析软件选取 *Bam*H I (5') 和 *Xho* I (3') 作为酶切位点, 以合成的质粒为模板, 根据 VP4 目的基因序列设计引物进行 PCR 扩增 (表 1), 用 TaKaRa 胶回收试剂盒按照说明书回收扩增产物, 选择 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 双酶切产物和 pET-28a (+) 空载质粒, 37 °C 水浴条件下恒温酶切 2 h 后, T4 连接酶 16 °C 过夜连接, 琼脂糖凝胶电泳判断条带位置与预期条带一致后, 质粒加入 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行转化, 第 2 天挑取 3~5 个单克隆菌落, 加入 1 mL LB 培养基 (按照 1% 的比例加入卡那霉素) 中 37 °C 摇至  $OD_{600\text{nm}}$  值为 0.6 时进行菌液 PCR。

表1 VP4基因PCR扩增引物

引物	序列 (5' → 3')	产物大小/bp
PoRV-VP4-F	CGGGATCCATGGCTTCATTAATATATATAGGCAATTG	2 463
PoRV-VP4-R	ACGCTCGAGCAGACGACATTGCATAATCAGATT	

注：上游引物下划线标注为 *Bam*H I 酶切位点，下游引物下划线标注为 *Xho* I 酶切位点。

### 1.3 VP4 重组蛋白的表达与纯化

鉴定质粒为阳性后，提取 pET-28a (+) -VP4 质粒，转化进 BL21 (DE3) 感受态细胞，小量诱导，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后通过考马斯亮蓝染色判断 VP4 蛋白表达的最佳诱导条件，加入终浓度为 0.8 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 37 °C 诱导表达 6 h，将大量表达的 VP4 蛋白包涵体部分用 8 mol/L 的尿素变性后经过复性纯化并通过超滤管进行蛋白的脱盐与浓缩，Western blot 验证该重组蛋白与小鼠抗轮状病毒血清的免疫反应性，以 1 : 1 000 稀释的 PoRV 阳性血清为一抗。

### 1.4 纯化蛋白免疫小鼠

选择 4 只 6~8 周龄的 BALB/c 雌鼠，将纯化后的 VP4 蛋白与弗氏完全佐剂在 4 °C 环境下以 1 : 1 的比例混匀乳化，装入 1 mL 容量的注射器进行首次免疫。腹腔注射 3 只小鼠 (编号 1~3)，每只小鼠注射量为 100 μg 作为试验组，剩余 1 只作为对照组，注射同等量 PBS 溶液与弗氏完全佐剂的混合溶液；2 周后进行第 2 次免疫，弗氏完全佐剂更换为弗氏不完全佐剂，2 周后第 3 次免疫；第 3 次免疫后 3 d，眼眶采血试验组及对照组，采血 200~500 μL，37 °C 静置 2 h 后 4 °C 过夜，第 2 天离心取上清液即血清。每只小鼠取 100~200 μL 血清，按照 1 : 100 稀释血清，用建立的间接 ELISA 检测方法判断小鼠抗体水平，1 d 后选取小鼠抗体水平最高的 1 只，进行冲击免疫，即不混合任何佐剂直接注射上次同等剂量的蛋白，阴性组注射相同量 PBS，3 d 后准备细胞融合试验。

### 1.5 细胞融合及间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞并亚克隆

准备细胞量 ≥ 80% 的 SP2/0 细胞 3~4 瓶，冲击免疫后 3 d 分离脾细胞，在 PEG4000 作用下按照 1 : 5~1 : 10 的比例进行细胞融合。事先备好含有 HAT 选择培养基的饲养细胞，将其铺至 96 孔细胞板。融合 5 d 后，取 100 μL 细胞培养上清用建立的间接 ELISA 方法进行检测，7 d 后重复检测。挑选阳性杂交瘤细胞进行 2~3 次亚克隆直至抗体阳性率达 100%。将稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株扩大培养并冻存于液氮中长期保存。

间接 ELISA 检测方法建立如下：碳酸盐缓冲溶液 CBS 稀释 VP4 蛋白至 1 μg/mL 及 1.5 μg/mL，每孔 100 μL 分别包被酶标板，4 °C 孵育 8 h 后选取 5% 脱脂乳封闭液于 37 °C 分别封闭 1 h 与 2 h；PBST 溶液洗涤 3 次，每孔加入待检样品 100 μL，4 °C 孵育 8 h；PBST 溶液洗涤 3 次，每孔加入 HRP 羊抗鼠酶标二抗 100 μL (1 : 5 000、1 : 10 000 稀释)，37 °C 孵育 1 h；PBST 溶液洗涤 3 次，每孔加入 100 μL TMB 显色液，室温避光孵育 20 min。每孔加入终止液 100 μL，酶联免疫检测  $OD_{450\text{nm}}$  值。

### 1.6 单克隆抗体的制备

6~8 周龄的 BALB/c 小鼠，状态稳定后注射 500 μL 的弗氏不完全佐剂致敏，小鼠腹部鼓胀后准备注射杂交瘤细胞。选取含有大约  $2 \times 10^6$  个细胞的悬液，离心后用 1 mL 无血清无抗生素的 DMEM 重悬细胞，腹腔注射小鼠。注射后一周左右当小鼠腹部明显鼓胀时用输液针采集小鼠腹水，连续采集 3 d 共收集 10 mL 左右，腹水在 4 °C 8 000 r/min 离心 15 min，去除杂质后 -20 °C 冻存，ELISA 测量效价，Western blot 验证抗体特异性，间接免疫荧光 (IFA) 验证抗体与病毒反应性。

### 1.7 琼脂糖凝胶电泳、SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色

琼脂糖凝胶电泳：将琼脂糖以 1%~1.5% 的比例加入 TAE 溶液里，微波炉加热至完全融化，加入 1% 核酸染料。将凝固后的核酸胶轻轻放入倒有 1×TAE 缓冲溶液的核酸电泳仪中，上样，按照正负极接通线路。30~45 min 后取出核酸胶，在紫外仪器下观察条带。

SDS-PAGE：蛋白样加入 5×SDS buffer 后在 100 °C 以上煮沸 10 min 使蛋白预变性。按照雅酶试剂盒说明书配制好 12.5% 蛋白胶，按照正确步骤将胶板插入电泳槽。倒入适量的 SDS 电泳缓冲液，上样后 80 V 电泳 30 min 将电压上调至 120 V 至电泳结束。

考马斯亮蓝染色：用雅酶公司购买的速染液在室温摇床染色 1 h 左右，用去离子水洗涤至胶底接近透明，出现明显蛋白条带。

### 1.8 Western blot 试验

预先配制好转印液。将转印槽的夹板负极置于下方摊开，3 层滤纸浸润转印液后重叠在海绵上，将蛋

白胶小心放置在滤纸上，盖上 NC 膜，再放 3 层浸润转印液的滤纸，合上后在转印槽内倒满转印液，接通电路，在冰浴条件下 300 mA 转印 2 h 左右。10% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h 后，选择一抗 4 ℃ 孵育 10~12 h。PBST 洗涤 3 次，二抗 1 : 5 000 稀释后室温孵育 45 min，PBST 洗涤 3 次，曝光验证条带。

### 1.9 IFA 试验

铺 3~4 个长满 MA104 细胞的 24 孔板，以感染复数 (MOI) = 1 的量将轮状病毒接种于 MA104 细胞，接毒至细胞出现明显病变后，用无血清无抗生素的 DMEM 清洗 2 次细胞，用 4% 的多聚甲醛室温固定 20 min 左右；后用 PBS 溶液轻轻洗涤 3 次，加入 0.1% Triton X-100 透膜，室温静置 10 min。PBS 洗涤 3 次，取杂交瘤上清或稀释后的抗体，37 ℃ 孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次后，羊抗鼠荧光二抗 1 : 5 000 稀释后避光加入，27 ℃ 避光孵育 45 min 左右。DAPI 染色 10 min 后用 PBS 洗涤，在倒置荧光显微镜下观察细胞。

### 1.10 病毒中和试验

将连续 10 倍稀释的 VP4 单克隆抗体，分别加入 200 TCID<sub>50</sub> PoRV 病毒液，二者等体积混合后加至生长状态良好的 MA104 细胞单层，2 h 后用无血清无抗生素的 DMEM 洗涤，维持 24 h 后作为感染组用 IFA 试验步骤观察细胞，并设置不做处理的 MA104 细胞作为对照组。

## 2 结果

### 2.1 重组蛋白 pET-28a (+) -VP4 的鉴定

通过在 GenBank 中查询到 RVA/Porcine - tc/KOR/174-1/2006/G8P [7] 株 (编号 MF940547.1) 的全长序列，通过 TMHMM 网站预测 VP4 蛋白不存在跨膜结构域 (图 1A)，经分析可以选择全长表达。选定酶切位点后，对金斯瑞公司寄送的合成质粒进行 PCR 扩增 (图 1B) 和双酶切鉴定 (图 1C)，条带大小与预期一致。

### 2.2 重组蛋白 pET-28a (+) -VP4 的表达鉴定

鉴定成功后后将 VP4 重组质粒转化并进行蛋白表达，考马斯亮蓝染色验证蛋白表达纯化前后情况 (图 2A)；使用 PoRV 感染阳性血清进行 Western blot 试验，证实 VP4 蛋白具有良好的抗原反应性 (图 2B)。

### 2.3 阳性杂交瘤细胞株的获得

小鼠免疫后检测血清效价，挑选免疫效果最好的小鼠进行细胞融合 (图 3)。共经过 4 次亚克隆，通过建立的间接 ELISA 检测方法 (最适蛋白包被浓度为 1 μg/mL，最适封闭时间为 37 ℃ 下封闭 2 h，酶标

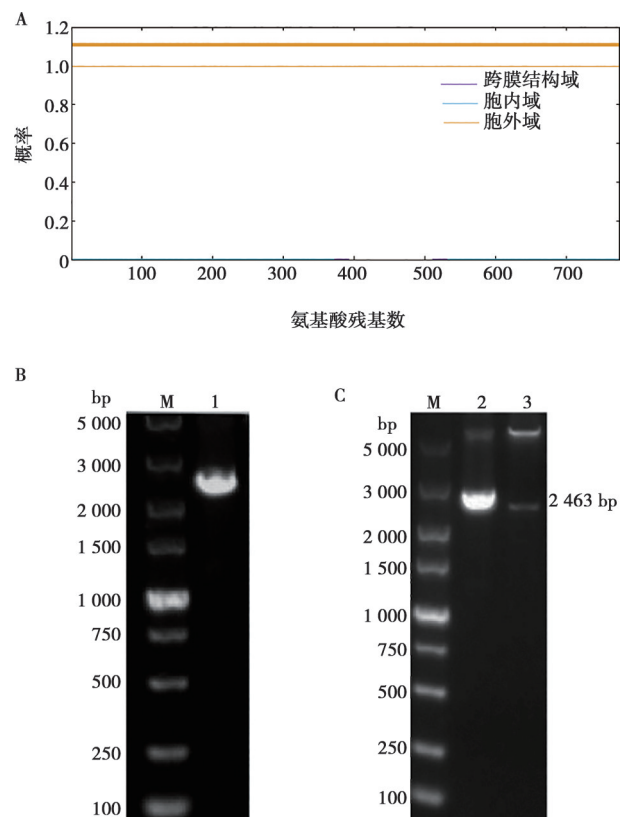
二抗最适稀释浓度为 1 : 5 000) 检测效价，筛选后得到 1 株状态稳定且持续分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株，命名为 4B10。

### 2.4 单克隆抗体效价测定及亚型鉴定

测定细胞上清液效价，杂交瘤细胞在 T25 细胞瓶的密度达到 80% 以上，收集细胞腹腔注射预先致敏的小鼠，得到小鼠单克隆抗体。用抗体亚型检测试剂盒鉴定出该株单克隆抗体重链亚型为 IgG1 型，轻链亚型为 Kappa 型，ELISA 测定 4B10 腹水稀释度在 1 : 3 000 000 以上，未检出中和活性。

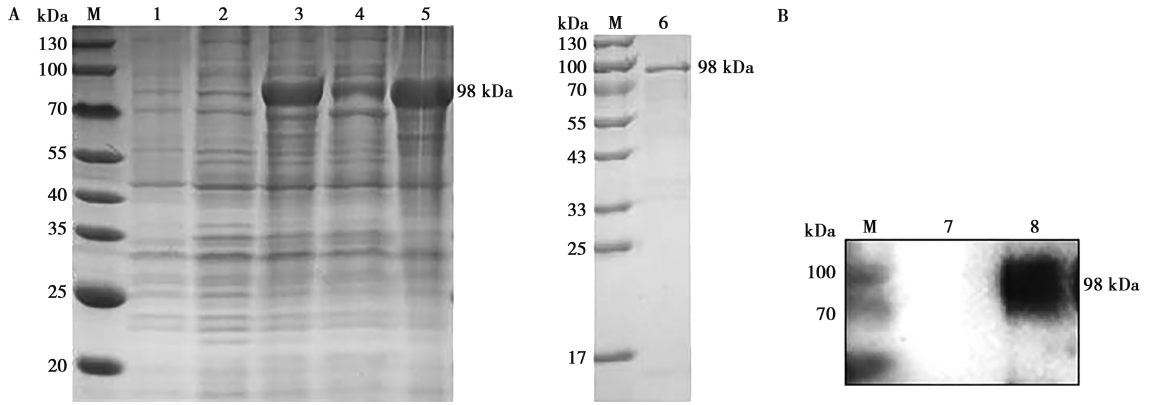
### 2.5 Western blot 验证单克隆抗体 4B10 与不同 PoRVA 的反应性

分别收集 PoRV NJ2012 和 G9P [7] 株感染 MA104 细胞样品的蛋白，经 SDS-PAGE 后转印至醋酸纤维素膜，以小鼠单克隆抗体 4B10 作一抗，HRP 标记羊抗鼠 IgG 作二抗，Western blot 分析结果显示，出现特异性条带，大小与轮状病毒 VP4 蛋白大小基本相符 (图 4)，而阴性小鼠腹水未见特异性条带。



M. DNA 分子量标准；1. VP4 基因普通 PCR 扩增产物；2、3. 重组质粒 pET28a (+) -VP4 双酶切产物。

图 1 VP4 基因的结构预测 (A) 及重组质粒 pET28a (+) -VP4 的 PCR (B) 和酶切 (C) 鉴定



M. 蛋白质分子质量标准; 1. BL21 (DE3) /pET-28a (+) 空载蛋白; 2. BL21 (DE3) /pET-28a (+) -VP4 未诱导的表达; 3. 重组蛋白 BL21 (DE3) pET-28a (+) -VP4 在 37 °C 12 h 条件下诱导全菌表达; 4. 重组蛋白 BL21 (DE3) pET-28a (+) -VP4 诱导在 37 °C 12 h 条件下诱导上清表达; 5. 重组蛋白 BL21 (DE3) pET-28a (+) -VP4 诱导在 37 °C 12 h 条件下诱导包涵体表达; 6. 重组蛋白 BL21 (DE3) pET-28a (+) -VP4 纯化后条带; 7. BL21 (DE3) pET-28a (+) 空载蛋白; 8. 重组蛋白 BL21 (DE3) pET-28a (+) -VP4。

图 2 重组蛋白 pET-28a (+) -VP4 的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

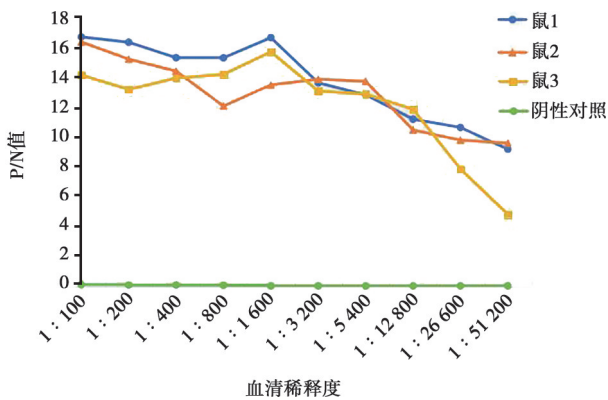
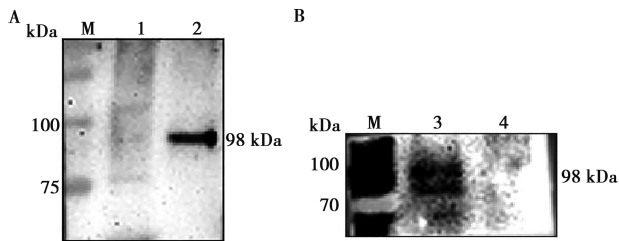


图 3 小鼠免疫后抗体水平

核染色, 结果显示, 感染 PoRV 试验组镜下可见绿色荧光, 而阴性对照组仅见蓝色细胞核 (图 5)。单克隆抗体 4B10 能够与猪 PoRVA 毒株 G9P [7] 的 VP4 蛋白特异性结合且荧光清晰。由于轮状细胞感染后易脱落, 故细胞量较少, 该抗体未见有中和活性。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. MA104 正常未感染细胞样; 2. 感染 PoRV NJ2012 的 MA104 细胞裂解物; 3. 感染 PoRV G9P [7] 的 MA104 细胞裂解物; 4. 未感染 PoRV 的 MA104 细胞裂解物。

图 4 单克隆抗体 4B10 与 PoRV NJ2012 (A) 及 G9P [7] 株 (B) 反应的 Western blot 鉴定

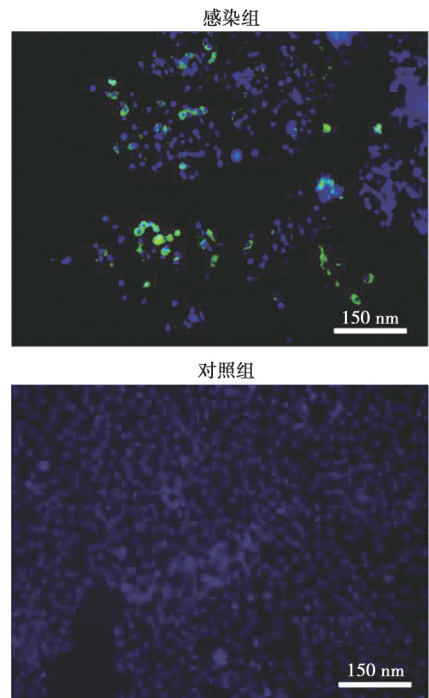


图 5 IFA 分析单克隆抗体 4B10 与猪 A 群轮状病毒 G9P [7] 反应性

### 2.6 IFA 验证单克隆抗体 4B10 与 PoRVA 的反应性

1 : 500 比例稀释 4B10 单克隆抗体作为一抗, 加至感染 PoRV G9P [7] 毒株的 MA104 细胞上, 以 FITC 标记羊抗鼠 IgG 为二抗, DAPI 染色液进行细胞

### 3 讨论

轮状病毒是与人类和动物的严重腹泻病相关的主

要病原体,是含有 11 个 RNA 节段的非囊膜病毒,外衣壳蛋白在其感染和免疫中起重要作用<sup>[12]</sup>。尽管随着人类轮状病毒疫苗在世界范围内的应用,其腹泻导致的死亡率有所下降<sup>[13]</sup>,但该病毒仍是 5 岁以下儿童严重脱水性腹泻的最常见原因。疫苗被普遍认为是历史上最成功的预防性干预措施之一,它们的发展需要持续的研究努力,以提高疗效和降低风险<sup>[12]</sup>。

VP4 是 PoRV 的一种非糖基化的外衣壳蛋白,被认为是毒力决定因素之一。此外,VP4 还诱导中和抗体在体外中和病毒,同时在体内被动保护小鼠免受异源轮状病毒的攻击<sup>[3]</sup>。进一步的研究表明,VP4 能有效地诱导动物的保护性免疫,VP4 蛋白水解裂解成 VP5 和 VP8 导致病毒感染性增强,编码轮状病毒蛋白 VP4、VP6 或 VP7 的 DNA 疫苗可诱导小鼠产生轮状病毒特异性血清抗体和病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应,但只有接种了编码 VP4 和 VP7 的 DNA 疫苗的小鼠才能检测到病毒中和抗体<sup>[14]</sup>。由此可见,VP4 蛋白在 PoRV 防治中起着重要的作用。由于 VP4 蛋白与保护性免疫相关,可将其作为疫苗的候选抗原,具体的 VP4 相关疫苗作用机制尚有待研究。

尽管逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和实时荧光定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 等分子方法对病毒基因组的检测具有很高的灵敏度,但这些技术并不经济,不能实际应用于该领域<sup>[15]</sup>。虽然已经有研究制备出兔和鼠的多克隆抗体用于检测方法研究,但由于它们识别目标抗原上的多个表位,所以特异性相对较低<sup>[16]</sup>。单克隆抗体同时具备特异性强、灵敏度高、制备成本相对较低等优点,在免疫学检测方法建立上具有重要价值,然而截至目前还未见开发出 VP4 蛋白单克隆抗体以及相关检测方法的报道。

本研究成功制备出 1 株特异性好、效价高的 VP4 蛋白单克隆抗体,为后期开发出灵敏度高、检测速度快、特异性好的 PoRV 检测方法奠定了基础。

## 参考文献:

- BRIDGER J C, CLARKE I N, MCCRAE M A. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus [J]. *Infect Immun*, 1982, 35 (3): 1058-1062.
- DOERKSEN T, CHRISTENSEN T, LU A, et al. Assessment of porcine Rotavirus-associated virome variations in pigs with enteric disease [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 270: 109447.
- QIAO X, LI G, WANG X, et al. Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 249.
- ZHANG H, ZHAO H, ZHAO Y, et al. Auxotrophic *Lactobacillus* expressing porcine rotavirus VP4 constructed using CRISPR-Cas9D10A system induces effective immunity in mice [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (9): 1510.
- COLLINS P J, MARTELLA V, BUONAVOGLIA C, et al. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P [32] [J]. *Vet Res*, 2010, 41 (5): 73.
- YI J, LIU C. Detection of a porcine rotavirus strain with VP4, VP7 and NSP4 genes of different animal origins [J]. *Arch Virol*, 2011, 156 (11): 2045-2052.
- GRAHAM K L, TAKADA Y, COULSON B S. Rotavirus spike protein VP5\* binds  $\alpha 2\beta 1$  integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (Pt 5): 1275-1283.
- LI W, FENG J, LI J, et al. Surface display of antigen protein VP8\* of porcine rotavirus on *Bacillus subtilis* spores using CotB as a fusion partner [J]. *Molecules*, 2019, 24 (20): 3793.
- KATO T, KAKUTA T, YONEZUKA A, et al. Expression and purification of porcine rotavirus structural proteins in silkworm larvae as a vaccine candidate [J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65 (3): 401-409.
- NELSON P N, REYNOLDS G M, WALDRON E E, et al. Monoclonal antibodies [J]. *Mol Pathol*, 2000, 53 (3): 111-117.
- GRILO A L, MANTALARIS A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37 (1): 9-16.
- DESSELBERGER U, HUPPERTZ H I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203 (2): 188-195.
- WANDERA E A, HATAZAWA R, TSUTSUI N, et al. Genomic characterization of an African G4P [6] human rotavirus strain identified in a diarrheic child in Kenya; evidence for porcine-to-human interspecies transmission and reassortment [J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 96: 105133.
- WEN X, WEI X, RAN X, et al. Immunogenicity of porcine P [6], P [7]-specific  $\Delta$ VP8\* rotavirus subunit vaccines with a tetanus toxoid universal T cell epitope [J]. *Vaccine*, 2015, 33 (36): 4533-4539.
- SONG W, FENG Y, ZHANG J, et al. Development of a multiplex reverse transcription-quantitative PCR (qPCR) method for detecting common causative agents of swine viral diarrhea in China [J]. *Porc Health Manag*, 2024, 10 (1): 12.
- RAMDANI Y, LAMAMY J, WATIER H, et al. Monoclonal antibody engineering and design to modulate FcRn activities: a comprehensive review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (17): 9604.