

帅文娜, 李佳乐, 郭子强, 等. 猪细小病毒 2 型 VP2 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 78-84.

SHUAI W N, LI J L, GUO Z Q, et al. Prokaryotic expression of VP2 protein of porcine parvovirus 2 and preparation of its polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 78-84.

猪细小病毒 2 型 VP2 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备

帅文娜¹, 李佳乐¹, 郭子强¹, 罗梦^{1,2}, 李丽薇^{1,3}, 周艳君^{1,3}, 姜一峰^{1,3},
童武^{1,3}, 童光志^{1,3}, 李兆龙^{4*}, 高飞^{1,3,5*}

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004;

3. 扬州大学/江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009;

4. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

5. 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要: 旨在制备猪细小病毒 (PPV) VP2 的多克隆抗体, 并进行其检测能力验证。将 PPV VP2 克隆至原核表达载体 pCold-TF, 由 1 mmol/L IPTG 诱导得到 VP2 蛋白; 纯化后 VP2 蛋白免疫新西兰大白兔, 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 检测结果显示, 多克隆抗体效价达 1 : 128 000; Western blot 和 IFA 分析表明, 其能特异性识别和结合 PPV, 说明重组 VP2 蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。本研究为 VP2 血清学检测方法的建立及其蛋白的功能研究提供了材料。

关键词: 猪细小病毒; VP2 蛋白; 多克隆抗体; 原核表达

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)08-0078-07

Prokaryotic expression of VP2 protein of porcine parvovirus 2 and preparation of its polyclonal antibody

SHUAI Wenna¹, LI Jiale¹, GUO Ziqiang¹, LUO Meng^{1,2}, LI Liwei^{1,3}, ZHOU Yanjun^{1,3}, JIANG Yifeng^{1,3},
TONG Wu^{1,3}, TONG Guangzhi^{1,3}, LI Zhaolong^{4*}, GAO Fei^{1,3,5*}

(1. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Yangzhou University/Jiangsu Collaborative Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China;

4. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

5. Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China)

Abstract: In this study, polyclonal antibodies to PPV VP2 were designed, prepared, and validated with porcine parvovirus (PPV) and eukaryotic plasmid pcDNA3.1 (+) -VP2-Myc. PPV VP2 was then cloned into the prokaryotic expression vector pCold-TF, and VP2 protein was induced by 1 mmol/L IPTG. Next, the purified VP2 protein was immunized against New Zealand white rabbits, and polyclonal antibodies were prepared and subjected to ELISA, Western blot; and IFA was used to verify their reactivity. The results of ELISA showed that the titer of the polyclonal antibody was as high as 1 : 128 000. The results of Western blot and IFA showed that the antibody could specifically recognize and bind to PPV, indicating that the recombinant VP2 protein had good immunogenicity and reactogenicity. This study is condu-

收稿日期: 2024-08-27; 修回日期: 2025-06-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800800, 2021YFD1801401); 上海市自然科学基金项目 (21ZR1476900); 国家自然科学基金项目 (32373050, 32072861); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-CSLPDCP-202402); 上海市兽医生物技术重点实验室开放基金项目 (BD1500010)

第一作者: 帅文娜, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 李兆龙, 副研究员, 主要从事植物乳酸菌分泌物作用机制方面的研究, E-mail: lizhaolong522@163.com; 高飞, 研究员, 主要从事兽医微生物及其分子生物学研究, E-mail: feigao@shvri.ac.cn。

cive to the establishment of a VP2 serological detection method and the functional study of VP2 protein.

Keywords: porcine parvovirus; VP2 protein; polyclonal antibodies; prokaryotic expression

猪细小病毒 (PPV) 属于细小病毒科、细小病毒属, 是一种无囊膜的单股 DNA 病毒。PPV 主要感染初产母猪, 引发母猪繁殖障碍, 临床特征是产死胎或木乃伊胎儿、胚胎早期死亡和不孕。此外, PPV 还会导致猪断奶后多系统消耗综合征、皮炎、腹泻、关节炎和呼吸系统疾病^[1-2]。PPV 的基因组全长大约为 5 000 bp, 由 2 个主要的开放阅读框 (ORF) 组成, 分别是 ORF1 和 ORF2。ORF1 编码非结构蛋白 (NS1、NS2 和 NS3), ORF2 编码结构蛋白 (VP1、VP2 和 VP3)。PPV 的非结构蛋白是参与调控病毒基因组复制的关键蛋白, 其中 NS1 是高度保守的主要非结构蛋白, 对晚期 RNA 的转录调控、宿主致病性、细胞毒性等也至关重要^[3]。NS2 蛋白在病毒衣壳组装和出核过程发挥关键作用, 并可能参与 PPV 激活 I 型干扰素的过程^[4]。病毒的衣壳由 VP1、VP2、VP3 组成, 其中 VP1 参与病毒结合并进入细胞的过程; VP3 由 VP2 蛋白翻译修饰形成, 维持衣壳结构的稳定; VP2 是衣壳蛋白最主要的成分, 具有血凝活性与自我装配功能, 能够组装成病毒样颗粒, 同时含有病毒重要的中和抗原表位, 是主要的免疫原性蛋白, 能够诱导机体发生免疫反应, 并通过与 PPV 受体的相互作用介导病毒感染^[5-6]。因此, VP2 蛋白能够作为猪细小病毒免疫学诊断的重要依据之一和基因工程亚单位疫苗研制的重要靶蛋白之一。

迄今为止, 猪群中已发现 8 种 PPV 基因型, 其中猪细小病毒 2 型 (PPV2) 于 2001 年在缅甸被偶然发现。2006—2007 年在中国东南部患有所谓“高热病”的猪中也发现了这种病毒。目前, PPV2 在临床和亚临床疾病中的病毒致病潜力仍有待确定^[7]。在本研究中, 通过免疫新西兰大白兔制备 PPV VP2 多克隆抗体, 继而进行间接免疫荧光试验 (IFA)、Western blot 等验证制备的多克隆抗体具有良好的特异性。PPV VP2 多克隆抗体的成功制备为进一步解析 PPV 致病机理以及检测方法的研发提供了试验材料和依据, 同时为以后 PPV 疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) - VP2 - Myc、PPV2 毒株 (NC001718)、人胚胎肾细胞系 (HEK 293T) 和猪睾丸细胞 (ST) 由中国农科院上海兽医研究所猪病防控技术团队构建并保存。大肠杆菌 TOP10 和大肠杆菌 BL21 感受态细胞为生工生物工程

(上海) 股份有限公司产品。质粒提取试剂盒为凯杰公司产品。胎牛血清 (FBS) 为 Thermo Fisher Scientific 公司产品。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品。Alexa Fluor-488 山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor-594 山羊抗鼠 IgG 为 Thermo Fisher Scientific 公司产品。SPF 级雌性新西兰大白兔购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 pCold-PPV-VP2 原核质粒的构建及鉴定

对从 GenBank 中查询得到的 PPV VP2 基因序列进行分析和设计, 委托北京擎科生物科技有限公司合成引物, VP2-F (*Xho* I): 5'-GCTCGGTACCCTCGA-GATGCACGCTAGCAGACTGATC-3', VP2-R (*Eco*RI): 5'-CGACAAGCTTGAATTCTCAGTACAGCTTCCGGGG-GA-3', 下划线处为酶切位点。以 VP2 全长基因序列为模板对 VP2 目的基因进行扩增后, 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*RI 对 pCold-TF 载体进行双酶切后, 通过同源重组酶将 VP2 基因序列与 pCold-TF 载体连接, 并验证是否成功构建 pCold-PPV-VP2 重组质粒。

1.3 VP2 重组蛋白的原核诱导表达与纯化

将原核表达质粒 pCold-PPV-VP2 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 涂布于含有氨苄抗性固体培养基中, 37 °C 倒置培养 12 h 左右, 挑取单克隆菌落于 37 °C, 220 r/min 摇床中培养直至细菌 OD_{600} 值在 0.6~0.8 后, 试验组按照 1:1 000 添加诱导剂 IPTG, 对照组不进行任何处理, 然后 16 °C、220 r/min 摇床低温诱导 16~20 h。诱导结束后 4 °C、10 min、8 000 r/min 离心菌液, 弃上清液, 加 PBS 重悬细菌沉淀, 冰上超声破碎菌液至菌液澄清透明, 4 °C、20 min、8 000 r/min 离心使上清液和沉淀相互分离。先利用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测质粒 pCold-PPV-VP2 的表达情况, 然后用尿素溶液和不同浓度咪唑溶液对诱导后的 PPV VP2 重组蛋白进行纯化并收集目的蛋白, 最后通过二喹啉甲酸法测定纯化后的蛋白浓度, 并对纯化蛋白 VP2 进行 Western blot 鉴定。

1.4 PPV VP2 多克隆抗体制备

将 4 只大白兔, 随机分成免疫组和对照组, 每组 2 只, 首次免疫时, 免疫组按照每只 1 mg 的免疫剂量计算纯化后 VP2 蛋白含量, 与等体积的弗氏完全佐剂充分混合形成稳定乳剂, 在兔的背部与皮下进行多点注射。首次免疫后的第 2 周与第 6 周分别再免疫 2 次, 使用弗氏不完全佐剂与纯化蛋白混合, 其他条件与首次免疫相同。在第 3 次免疫后的 2 周对免疫兔

进行耳缘静脉采血,分离血清并制备抗体。对照组的2只大白兔,只注射与免疫组等体积佐剂,其他条件与免疫组相同。

1.5 PPV VP2 多克隆抗体效价测定

用碳酸盐包被缓冲液将纯化的重组蛋白 VP2 稀释至 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度并包被至酶标板中,在 4°C 条件下过夜。接着,用磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤酶标板 3 次,用 5% 脱脂乳 37°C 孵育 2 h 进行封闭,用 PBST 洗涤 3 次。然后,使用不同稀释度的免疫组的多抗血清作为一抗,同时以只注射佐剂的兔血清为阴性对照, 37°C 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 次;使用 $1:2\,000$ 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 37°C 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 次;加入 TMB 显色液,避光条件下显色 15 min,加入 2 mol/L 终止液终止反应。最后根据酶标仪在 450 nm 波长下测的吸光度值,对血清的效价进行测定。结果判定:当 $P/N \geq 2.1$ 时判为阳性; P/N 值 < 2.1 , 但 ≥ 1.5 为可疑; P/N 值 < 1.5 为阴性。以阳性血清最大稀释倍数为多克隆抗体的效价。

1.6 VP2 多克隆抗体 Western blot 鉴定

通过 Western blot 鉴定 VP2 多抗的特异性,在六孔板中铺 ST 细胞,当细胞生长的密度约占每孔的 80% 时,进行如下试验: PPV 以 0.1 感染比感染 ST 细胞,并在相同条件下设置阴性对照,2 组均 37°C 培养 1 h 后换液,36 h 后收蛋白,即用 $200 \mu\text{L}$ RIPA 冰上裂解细胞 15 min 后, 4°C 、10 min、 $1\,2000 \text{ r}/\text{min}$ 离心后取含有蛋白的上清液进行 SDS-PAGE 并转膜。用 TBST 洗膜 3 次,5% 脱脂乳室温封闭 2 h; TBST 洗膜 3 次,以制备的 VP2 多抗 ($1:500$) 为一抗室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次,HRP 标记的山羊抗兔 IgG ($1:6\,000$) 作为二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次;最后加入显色液进行显影拍照。

在六孔板中铺 HEK 293T 细胞,当细胞生长的密度约占每孔的 80% 时,将真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)-VP2-Myc 分别以每孔 0.5、1.0、2.0 和 $3.0 \mu\text{g}$ 剂量转染至 HEK 293T 细胞,同时在相同条件下将空载质粒转染至 HEK 293T 细胞作为对照组,2 组均 37°C 培养 6 h 后换液,24 h 后收蛋白:即用 $200 \mu\text{L}$ RIPA 冰上裂解细胞 15 min 后, 4°C 、10 min、 $1\,2000 \text{ r}/\text{min}$ 离心后取含有蛋白的上清液进行 SDS-PAGE 并转膜。用 TBST 洗膜 3 次,5% 脱脂乳室温封闭 2 h; TBST 洗膜 3 次,以制备的 VP2 兔多抗 ($1:500$) 与鼠抗 Myc 标签抗体 ($1:1\,000$) 分别为一抗室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次,HRP 标记的山羊抗兔 IgG ($1:6\,000$) 与山羊抗鼠 IgG ($1:6\,000$) 作为二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次;最

后加入显色液进行显影拍照。

1.7 VP2 多克隆抗体 IFA 鉴定

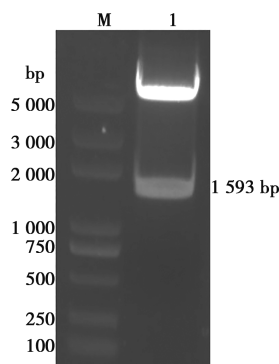
在六孔板中铺 ST 细胞,当细胞生长的密度约占每孔的 80% 时,进行如下试验: PPV 以 0.1 感染比感染 ST 细胞, 37°C 培养 36 h,并在相同条件下设置阴性对照。然后,冰甲醇冰上固定细胞 20 min 后,用 5% 牛血清白蛋白 37°C 封闭 2 h,用 PBS 对制备的 VP2 兔多抗进行 $1:500$ 稀释后作为一抗, 37°C 孵育 1 h 后,按照 $1:6\,000$ 稀释山羊抗兔荧光二抗检测 PPV 感染 ST 细胞后 VP2 蛋白的表达。

在六孔板中铺 HEK 293T 细胞,当细胞生长的密度约占每孔的 80% 时,将真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)-VP2-Myc 转染 HEK 293T 细胞, 37°C 培养 24 h,同时在相同条件下将空载质粒 pcDNA3.1 (+) 转染至 HEK 293T 细胞作为对照。然后,冰甲醇冰上固定细胞 20 min 后,用 5% 牛血清白蛋白 37°C 封闭 2 h,以制备的 VP2 兔多抗 ($1:500$) 和鼠抗 Myc 标签抗体 ($1:1\,000$) 分别作为一抗, 37°C 孵育 1 h 后,按照 $1:6\,000$ 比例稀释山羊抗鼠与山羊抗兔的荧光二抗检测真核质粒 pcDNA3.1 (+)-VP2-Myc 转染至 HEK 293T 细胞后 Myc 标签蛋白与 VP2 蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 pCold-PPV-VP2 重组质粒的构建及鉴定

对构建的重组质粒 pCold-PPV-VP2 进行 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后,核酸胶电泳产生条带,与 $1\,593 \text{ bp}$ 目标大小一致。胶回收酶切片段并送公司测序验证序列正确,证明 pCold-PPV-VP2 重组质粒构建成功 (图 1)。



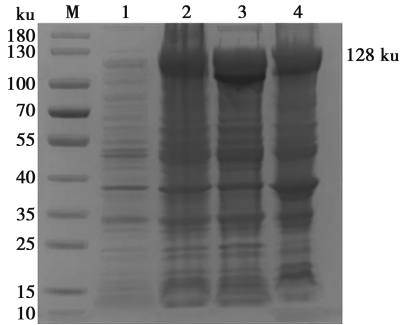
M. DNA 分子质量标准; 1. *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切 pCold-PPV-VP2。

图 1 原核表达质粒 pCold-PPV-VP2 的构建及鉴定

2.2 VP2 重组蛋白的原核诱导表达与纯化

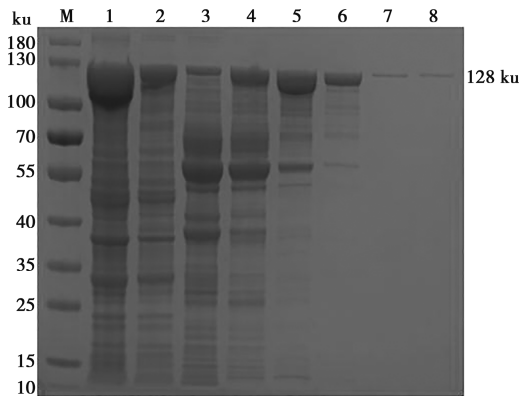
将原核表达质粒 pCold-PPV-VP2 转化至 BL21

感受态细胞，诱导剂 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 结果显示，VP2 蛋白同时表达于上清液与沉淀内，但上清液表达量高于沉淀，在 128 ku 处有一明显条带，符合预期（图 2）。对大量诱导菌液超声后的上清液蛋白进行一系列的洗涤纯化，经 SDS-PAGE 分析得到 VP2 蛋白条带（图 3）。通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度为 2.5 mg/mL。以 VP2 纯化蛋白作抗原，Western blot 结果显示，在 128 ku 处出现了单一的特异性目的条带（图 4），证明已成功纯化目的蛋白 VP2。



M. 蛋白质分子质量标准；1. 未诱导的 pCold-VP2 重组菌液；2. IPTG 诱导的 pCold-VP2 重组菌液；3. IPTG 诱导的 pCold-VP2 重组菌液上清液；4. IPTG 诱导的 pCold-VP2 重组菌液沉淀。

图 2 SDS-PAGE 检测 VP2 蛋白重组表达



M. 蛋白质分子质量标准；1. 流穿液；2~8: 10、40、60、80、100、200、500 mmol 咪唑洗脱。

图 3 SDS-PAGE 分析重组 VP2 蛋白纯化效果

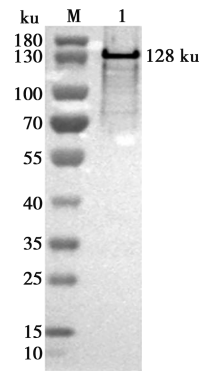
2.3 多克隆抗体效价的测定

第 3 次免疫结束后的 2 周，对兔进行耳缘静脉采血，离心分离血清获得多克隆抗体；用 PBST 按照不同的梯度（1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000、1 : 32 000、1 : 64 000、1 : 128 000）稀释血清，通过间接 ELISA 测定多克隆抗

体的效价。结果表明（表 1，图 5），抗体稀释度为 1 : 128 000 时，P/N>2.1，即纯化蛋白 VP2 具有良好的抗原性和免疫原性，可以诱导动物产生高效价的抗体，能够进行后续试验。

2.4 兔抗 VP2 多克隆抗体 Western blot 鉴定

将真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) -VP2-Myc 转染到 293T 细胞后，裂解细胞提取蛋白，将制备的兔血清作为一抗，进行 Western blot 试验，结果显示试验组出现了特异性目的条带，而空载转染对照组则无条带，且 VP2 蛋白的表达量随着转染质粒剂量的增加而增加（图 6）。同时，用 PPV 感染 ST 细胞后，裂解细胞提取蛋白，进行 Western blot 试验，结果显示试验组也出现了特异性目的条带，而阴性对照组则无条带，即 VP2 多克隆抗体能够识别 PPV 感染细胞表达的 VP2 蛋白（图 7）。以上结果都表明 VP2 多克隆抗体可以特异性识别真核质粒转染 293T 细胞和 PPV 感染 ST 细胞后表达的 VP2 蛋白。



M. 蛋白质分子质量标准；1. VP2 重组蛋白。

图 4 VP2 重组蛋白 Western blot 鉴定

表 1 重组蛋白 VP2 多克隆抗体效价检测

血清稀释倍数	P/N 值	
	免疫兔 1/阴性兔 1	免疫兔 2/阴性兔 2
1 : 1 000	16.5	15.3
1 : 2 000	23.9	21.4
1 : 4 000	25.7	26.4
1 : 8 000	23.4	25.1
1 : 16 000	23.4	23.7
1 : 32 000	14.7	14.5
1 : 64 000	9.5	11.1
1 : 128 000	8.0	8.3

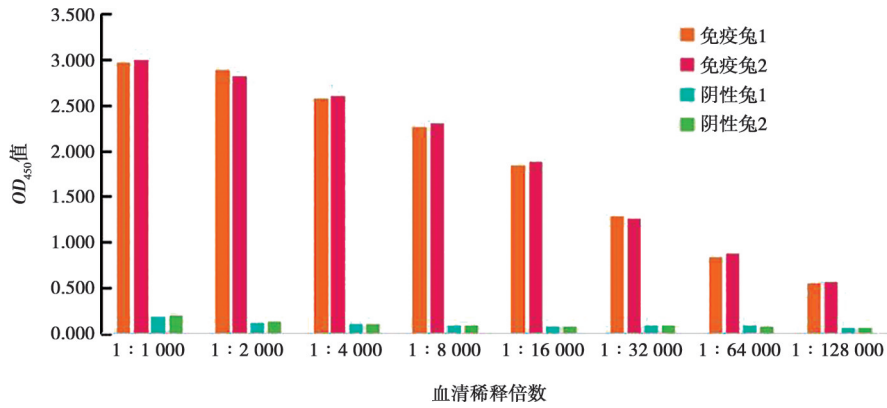
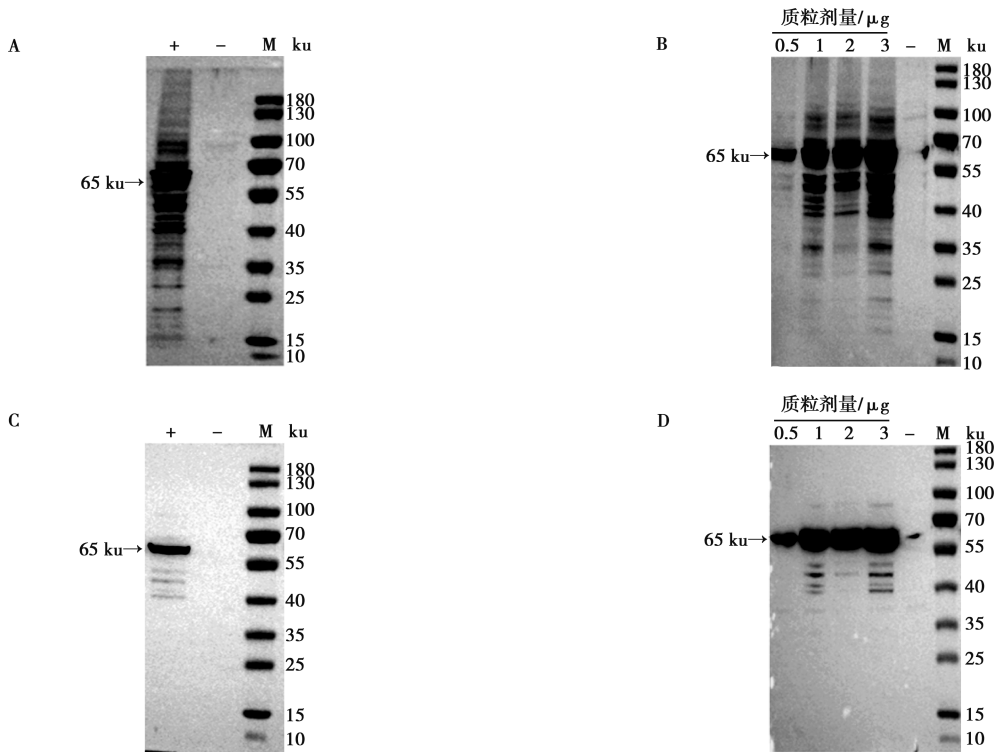


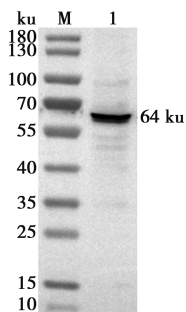
图5 兔血清抗体效价测定



M. 蛋白质分子质量标准; +. pcDNA3.1 (+) -VP2-Myc 质粒; -. 阴性对照。

A. VP2 标签抗体验证 VP2 表达; B. VP2 标签抗体验证梯度 VP2 表达; C. Myc 抗体验证 VP2 表达; D. Myc 抗体验证梯度 VP2 表达。

图6 VP2 多克隆抗体通过 Western blot 检测 293T 细胞中过表达的 VP2 蛋白



M. 蛋白质分子质量标准; 1. PPV。

图7 VP2 多克隆抗体通过 Western blot 检测被 PPV 感染的 ST 细胞表达的 VP2 蛋白

2.5 兔抗 VP2 多克隆抗体 IFA 鉴定

将真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) -VP2-Myc 转染 293T 细胞 24 h 后, 经过 IFA 检测, 能够清楚观察到 VP2 抗体的绿色荧光和 Myc 标签抗体的红色荧光 (图 8)。此外, PPV 感染 ST 细胞 36 h 后, 经过 IFA 检测, 同样出现了特异性 VP2 抗体的红色荧光, 阴性对照组则不显示荧光 (图 9)。以上结果同样表明 VP2 多克隆抗体可以特异性识别真核质粒转染 293T 细胞后和 PPV 感染 ST 细胞后表达的 VP2 蛋白。

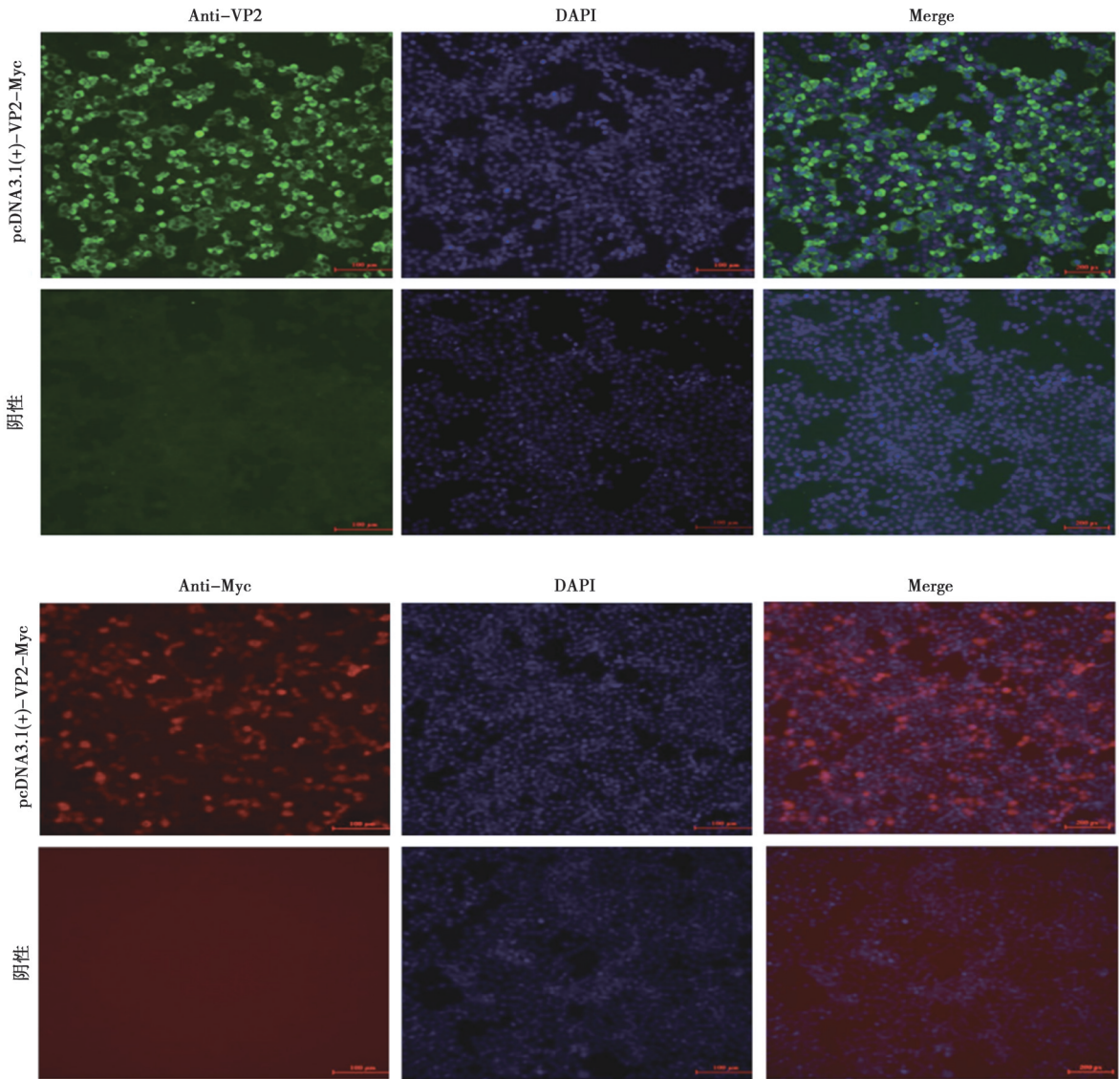


图 8 VP2 多克隆抗体通过 IFA 检测 293T 细胞中过表达的 VP2 蛋白 (200×)

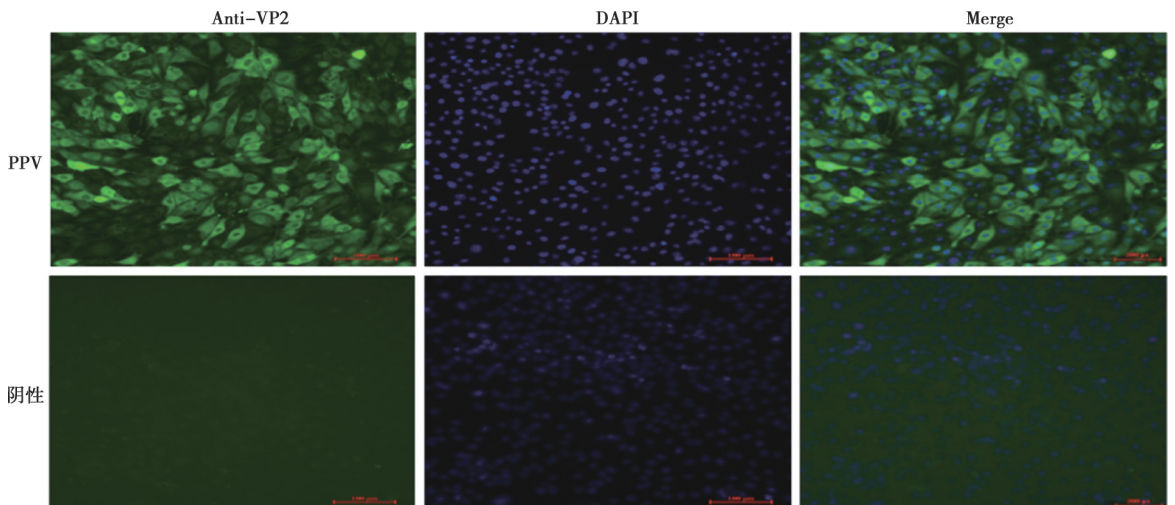


图 9 VP2 多克隆抗体通过 IFA 检测被 PPV 感染的 ST 细胞表达的 VP2 蛋白 (200×)

3 讨论

PPV 是一种全球范围内普遍存在的、严重影响母猪繁殖性能的病毒,对各种年龄、性别的猪都易感,特别对初产母猪和仔猪的危害最为严重^[8]。自 PPV2 在 2001 年缅甸进行戊型肝炎病毒血清调查时被发现以来,PPV2 一直被广泛深入研究。Csagola 等^[9]通过对感染 PPV2 猪群的病毒载量、抗体水平和临床体征的研究,证实 PPV2 也会导致呼吸道疾病。何玉^[10]研究发现,PPV2 的流行存在季节性,冬春季的检出率 (73.0%) 高于夏秋季节 (16.4%)。同时, Kim 等^[11]通过对 PPV2 与 PCV2 混合感染的病例进行研究,发现 PPV2 能够与 PCV2 发生协同作用,即 PPV2 的存在会刺激 PCV2 复制从而加重 PCV2 引起的相关疾病。此外,PPV2 与 PPV7 也会经常发生混合感染,其混合感染率高达 35.83%^[12]。

VP2 蛋白是主要的衣壳蛋白,含有大量诱导中和抗体产生的 B 细胞表位,是 PPV 疫苗的主要保护抗原并具有自组装功能,可自组装成病毒样颗粒,在研发疫苗和诊断试剂中发挥重要作用^[13]。有研究证明,VP2 基因序列决定着 PPV 的种系进化以及病毒的血凝活性、组织嗜性及宿主范围,VP2 暴露在外的几个氨基酸残基 (378、383、436 等) 是决定病毒趋向性和毒力的关键位点^[14]。

目前对 PPV2 的研究主要集中在遗传进化方面,而对其基因功能的研究尚不深入。高效价抗体是检测基因表达和研究基因功能的重要手段之一,其中多克隆抗体由于其制备过程简单快捷以及具有多个抗原簇结合位点等优点,而在免疫学应用上有着广泛的空间。由于 VP2 蛋白是作为 PPV 疫苗研制和检测的首选靶蛋白,因此本研究构建了表达 PPV2 VP2 结构蛋白的重组质粒,表达、纯化重组蛋白后,通过免疫大白兔成功制备多克隆抗体,并利用该多抗通过 Western blot 与 IFA 检测重组蛋白的反应原性与 PPV 的病毒学特性,间接 ELISA 方法检测多克隆抗体的效价。结果显示,制备的多克隆抗体特异性良好,且效价可达 1:128 000。

综上所述,本研究所制备的多克隆抗体为建立检测 VP2 蛋白的抗原捕获 ELISA,以及揭示 PPV 对宿主细胞功能影响的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] MENGELING W L, LAGER K M, VORWALD A C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance [J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 60-61: 199-210.
- [2] STRECK A F, CANAL C W, TRUYEN U. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 36: 300-306.
- [3] CAO L, FU F, CHEN J, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of porcine parvovirus NS1 protein mediated by the CRM1 nuclear export pathway and the importin α/β nuclear import pathway [J]. *J Virol*, 2022, 96 (1): e0148121.
- [4] LIN W, QIU Z, LIU Q, et al. Interferon induction and suppression in swine testicle cells by porcine parvovirus and its proteins [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 163 (1/2): 157-161.
- [5] XU Y, CUI L, TIAN C, et al. Immunogenicity of recombinant classic swine fever virus CD8 (+) T lymphocyte epitope and porcine parvovirus VP2 antigen coexpressed by *Lactobacillus casei* in swine via oral vaccination [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18 (11): 1979-1986.
- [6] 夏娜, 黄凯, 王瑜, 等. 猪细小病毒分子生物学研究进展 [J]. *中国畜禽种业*, 2023, 19 (1): 17-21.
- [7] XIAO C T, GERBER P F, GIMÉNEZ-LIROLA L G, et al. Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA [J]. *Veterinary microbiology*, 2013, 161 (3/4), 325-330.
- [8] 张秀娟. 猪细小病毒及其非结构蛋白 NS1 和 NS2 诱导猪胎盘滋养层细胞自噬作用与机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [9] CSÁGOLA A, ZÁDORI Z, MSZÁROS I, et al. Detection of porcine parvovirus 2 (ungulate tetraparvovirus 3) specific antibodies and examination of the serological profile of an infected swine herd [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0151036.
- [10] 何玉. 猪细小病毒 2 型分子流行病学调查、结构蛋白免疫原性分析和抗体检测 ELISA 方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [11] KIM S C, KIM J H, KIM J Y, et al. Prevalence of porcine parvovirus 1 through 7 (PPV1-PPV7) and co-factor association with PCV2 and PRRSV in Korea [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18 (1): 133.
- [12] 许夕雅, 韩紫薇, 杨寒, 等. 河南省猪细小病毒 2 型流行特征和遗传进化分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60 (9): 23-29.
- [13] MARTÍNEZ C, DALSGAARD K, DE TURISO J A L, et al. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity [J]. *Vaccine*, 1992, 10 (10): 684-690.
- [14] 禹婷婷, 黄勇, 张樑, 等. 猪细小病毒 VP2 的原核表达与多克隆抗体制备 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37 (5): 47-52.