

刘晴晴, 孙杨杨, 孙萌, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (3): 58-65.

LIU Q Q, SUN Y Y, SUN M, et al. Preparation and epitope characterization of monoclonal antibodies against cap protein of porcine circovirus type 2 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (3): 58-65.

猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位鉴定

刘晴晴, 孙杨杨, 孙萌, 王衡萱, 孙海凤, 姜平*, 白娟*

(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 210014)

摘要: 本研究旨在制备猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 衣壳蛋白 (Cap) 的单克隆抗体, 并对其识别的抗原表位进行鉴定, 为 Cap 蛋白结构和中和抗原表位特性的研究提供数据支持。试验通过细胞杂交瘤技术, 共筛选出 6 株单克隆抗体, 命名为 2B6、3D4、3F6、4C4、5G4 和 6A7。经酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测, 所有单抗杂交瘤细胞传代稳定, 小鼠腹水单抗效价达最高达 $1:1.28 \times 10^7$ 。Western blot 及间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定抗体特异性及中和活性, 结果显示单抗均能特异性识别 PCV2, 且 2B6 和 4C4 单抗具有 PCV2 中和活性, 中和效价均为 $1:128$ 。进一步利用 Western blot 鉴定单抗识别的抗原表位, 结果表明, 2B6、3D4、3F6 和 6A7 识别抗原表位²⁰³ENSIYDQDYN²¹², 4C4 和 5G4 识别抗原表位²²³EFNLK-DPPLNPK²³⁴。综上, 本试验成功筛选出 2 株具有 PCV2 中和活性的单抗, 并鉴定其识别的抗原表位, 为后续阐明 PCV2 的致病机制、表位疫苗设计等奠定基础。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 衣壳蛋白; 单克隆抗体; 中和活性; 抗原表位鉴定

中图分类号: S851 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)03-0058-08

Preparation and epitope characterization of monoclonal antibodies against cap protein of porcine circovirus type 2

LIU Qingqing, SUN Yangyang, SUN Meng, WANG Zhunxuan, SUN Haifeng, JIANG Ping*, BAI Juan*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal

Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to prepare monoclonal antibodies (mAbs) against the capsid (Cap) protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) and to identify their recognized antigenic epitopes, so as to provide data to support research on the structure of the Cap protein and the characteristics of its neutralizing epitopes. Using hybridoma technology, six mAbs were successfully screened and designated as 2B6, 3D4, 3F6, 4C4, 5G4, and 6A7. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results showed that all hybridoma cell lines were stably passaged, and the titers of the ascitic mAbs reached up to $1:1.28 \times 10^7$. Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) were performed to evaluate the specificity and neutralizing activity of the mAbs. The results indicated that all mAbs specifically recognized PCV2, and among them, 2B6 and 4C4 exhibited neutralizing activity against PCV2 with a neutralizing titer of $1:128$. Further epitope mapping by Western blot revealed that mAbs 2B6, 3D4, 3F6, and 6A7 recognized the linear epitope²⁰³ENSIYDQDYN²¹², while mAbs 4C4 and 5G4 recognized the linear epitope²²³EFNLKDPPLNPK²³⁴. In conclusion, this study successfully obtained two neutralizing mAbs and identified two linear epitopes on the PCV2 Cap protein. These findings served as an important theoretical basis for further elucidating the neutralizing mechanism of PCV2 and for designing epitope-based vaccines.

Keywords: porcine circovirus type 2; Cap protein; monoclonal antibodies; neutralizing activity; epitope mapping

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 分为 4 个

种: PCV1、PCV2、PCV3 和 PCV4^[1-2], 其中, PCV2 被广泛认为是 PCV 相关疾病 (PCVAD) 的主要致病因子, 能够加剧其他细菌和病毒的感染, 对养猪业造成显著的经济损失^[3-4]。PCV2 基因组全长约为 1 766~1 768 个碱基对, 包含 11 个开放阅读框 (ORFs), 其中 ORF1 和 ORF2 因其重要性而广受研究^[5]。ORF2 编码衣壳蛋白 (Cap), 是病毒的主要结构蛋白, 也是免疫反应的主要靶点^[6], 能够诱导机

收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2026-01-05

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX (22) 1011); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-35)

第一作者: 刘晴晴, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 姜平, 主要从事动物传染病学的基础与研究工作, E-mail: jiangp@njau.edu.cn; 白娟, 主要从事兽医生物制品学教学与研究工作, E-mail: baijuan@njau.edu.cn。

体产生中和抗体，是疫苗研发的关键靶标。PCV2 衣壳蛋白能够自组装成平均半径为 8.36 nm 的病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)，呈现出二十面体形态^[7-8]。血清学结果表明，使用体外组装的 PCV2 VLP 可获得高滴度的中和抗体，为仔猪免受同源基因型 PCV2 感染提供有力的保护^[9]。目前，PCV2 Cap 蛋白的单抗多用于建立检测诊断方法，但 PCV2 中和抗原表位的相关研究较少，且抗原表位位点尚不十分清楚。

本试验使用杆状系统表达的 PCV2 Cap 蛋白，成功研制出 6 株单克隆抗体，其中 2 株具有显著中和活性，并已确定抗体识别的抗原表位，可为 PCV2 研究提供有用生物材料。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株、试剂和实验动物

PCV2 WG09 毒株 (GQ845027.1)，PK-15 细胞系、SP2/0 骨髓瘤细胞、原核表达载体 pET-32a (+)、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta (DE3)、PCV2 阴性腹水、PCV2 ORF2 基因重组杆状病毒 rBcapokm 质粒、重组 Cap 蛋白及杆状病毒表达的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) N 蛋白均由本实验室保存。本研究使用的 PCV2 Cap 蛋白的单克隆抗体 3E5^[12] 由本实验室制备并纯化，该抗体通过原核表达的 PCV2 CapC 蛋白免疫小鼠制备而成，经中和试验证明具有显著中和活性。

2 \times Phanta Max Master Mix 和 Pres-tained Protein Marker 购自南京诺唯赞生物公司；限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Xho* I 和 T4 DNA LIGASE 购自美国赛默飞公司；细胞裂解液、辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgG、弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自上海碧云天生物技术有限公司；HisSep Ni-NTA Agarose Resin 购自上海翊圣生物科技有限公司；DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司；异硫氰酸荧光素 (FITC)-羊抗鼠 IgG、小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自武汉三鹰生物科技有限公司；Tanon ECL 化学发光液购自天能科技有限公司；异丙基硫代- β -D-半乳糖 (IPTG)、PEG1450、50 \times HAT 和 50 \times HT 购自美国 Sigma 公司；质粒 DNA 小剂量提取试剂盒购自济南朋远生物技术有限公司；Biospin 胶回收试剂盒购自北京博迈斯科技发展有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

SPF 级 BALB/c 雌鼠 (7~8 周龄) 及 ICR 雌鼠 (5~7 周龄) 各 5 只，编号 1~5，均购自扬州大学实验动物中心。

1.2 小鼠免疫

根据文献 [10] 方法首次免疫时将纯化的 Cap 蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合后加入灭菌钢珠，在匀浆仪中充分振荡乳化。取 5 只 SPF 级 BALB/c 雌鼠，分别编号为 1~5 号小鼠。按照每只小鼠 50 μ g 剂量进行皮下注射，加强免疫使用弗氏不完全佐剂。三免 10 d 后使用间接 ELISA 方法测定小鼠抗体效价，选取效价最高的小鼠进行细胞融合，融合 4 d 前进行腹腔加强免疫。

1.3 间接 ELISA 方法

使用重组 Cap 蛋白作为阳性抗原，杆状病毒表达 PRRSV N 蛋白作为模式阴性抗原。杂交瘤细胞上清液作为一抗，同时设立阳性对照 (免疫小鼠血清 1:100 稀释) 和阴性对照 (SP2/0 细胞上清液)；羊抗鼠 IgG (H+L)-HRP 二抗孵育；TMB 显色后加入终止液，酶标仪检测 $OD_{450\text{nm}}$ 值时的读数。阳性抗原包被板的 $OD_{450\text{nm}}$ 值为 P1 值，模式阴性抗原包被板的 $OD_{450\text{nm}}$ 值为 P2 值，当 $(P1-P2)/N \geq 2.1$ 时判定为阳性。

1.4 杂交瘤细胞筛选与单抗小鼠腹水制备

取进行冲击免疫的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞，按照 1:7 至 1:10 的比例进行细胞融合。融合 1 周后对细胞进行全换液，3 d 后进行抗体效价检测。选取阳性细胞进行 2~3 次细胞亚克隆以获得稳定分泌抗体的细胞，随后扩大培养至 T25 细胞瓶中。单抗细胞注入致敏小鼠腹腔以获取腹水，检测抗体效价后置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 单克隆抗体特性鉴定

1.5.1 杂交瘤细胞稳定性与单克隆抗体亚类鉴定

将阳性杂交瘤细胞进行稳定传代培养，第 5、10、15 和 20 代各冻存 2 支细胞，收集上清液测定抗体效价。按照抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行抗体亚型鉴定。

1.5.2 Western blot 鉴定

以杆状病毒表达的 PCV2 重组 Cap 蛋白、感染 PCV2 48 h 的 PK-15 细胞为阳性样品，同时设置杆状病毒表达的 PRRSV N 蛋白和未接毒的 PK-15 细胞作为相应的阴性对照，进行 SDS-PAGE。一抗使用获得的单抗腹水，使用 HRP 标记羊抗鼠二抗进行 Western blot 鉴定。

根据文献 [11] 进行免疫荧光试验 (IFA) 检测。PCV2 接种 PK-15 细胞，37 $^{\circ}$ C 培养 48 h，加入预冷的甲醇固定 20 min，PBS 洗涤后加入单抗 37 $^{\circ}$ C 作用 1h，洗涤后加入 FITC-羊抗鼠 IgG，37 $^{\circ}$ C 作用 1h，洗涤后于荧光倒置显微镜下观察。

根据文献 [12] 方法进行中和试验检测。将本

研究制备的单克隆抗体、具备 PCV2 中和活性的 3E5 单抗腹水、不具备 PCV2 中和活性的无关腹水进行 2 倍比稀释，与稀释至 200 倍的组织培养半数感染剂量 (TCID₅₀) 的 PCV2 病毒液等体积混合，置于 37 °C 温箱作用 1 h。PCV2 接种 PK-15 细胞洗涤后加入病毒与抗体作用后的混合液，温箱孵育 1.5 h。洗涤后换为纯 DMEM 维持液。48 h 后参照 IFA 鉴定方法于倒置显微镜下观察荧光情况。设置 PCV2 阴性腹水作为阴性对照，PCV2 3E5 单抗腹水作为阳性对照，PK-15 接毒细胞作为空白对照。与阴性对照孔比较，以能够减少 50% 荧光细胞数量的单抗最大稀释度作为

该单抗的中和效价。

1.6 B 细胞抗原表位鉴定

根据 PCV2 Cap 蛋白重组杆状病毒目的基因序列，设计 PCR 引物，送南京金斯瑞公司合成，序列如表 1 所示。采用 PCR 方法扩增出 9 个 Cap 蛋白基因截短体，克隆至 pET-32a (+) 质粒，转化至大肠杆菌 Rosetta 菌株，IPTG 诱导表达。以 His 抗体作为一抗，利用 Western blot 鉴定蛋白表达是否正确。以单抗细胞腹水稀释液作为一抗，通过 Western blot 鉴定单抗针对的 B 细胞抗原表位。

表 1 Cap 蛋白基因截短体 PCR 引物序列

引物名称	序列 (5'→3')	扩增区域/aa	基因长度/bp
F1	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~78	285
	GCCACCCTCGAGGTCGTGATGTTGAAGCCATCATGTC		
F2	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~162	510
	GCCACCCTCGAGGGTGAAGTAGCGGCTGTGGTAG		
F3	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~172	540
	GCCACCCTCGAGGTCGATGTTGCGGTCCAGCA		
F4	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~182	570
	GCCACCCTCGAGCTGTTGCGCTTGTGTTGGCC		
F5	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~192	600
	GCCACCCTCGAGGTTGCCGTTGCTGCAGGC		
F6	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~202	630
	GCCACCCTCGAGGAAGGCGGTGCCAGGCC		
F7	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~212	660
	GCCACCCTCGAGGTTGTAGTCTGTTGCTAGATGCTGTTT		
F8	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~222	690
	GCCACCCTCGAGGCGGAAGTGCACGTACATGTTGATG		
F9	GCCACCAAGCTTATGGCTACCCCGCCG	1~234	729
	GCCACCCTCGAGTCACTTGGGTTTCAGGGGGG		

注：下划线部分为 *Hind* III、*Xho* I 酶切位点。

1.7 抗原表位的保守性分析

从 GenBank 数据库下载 PCV1、PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 和 PCV2e 共计 23 株代表毒株的 Cap 蛋白氨基酸序列，分析单抗识别的抗原表位在各 PCV 毒株中的保守性。

2 结果

2.1 免疫小鼠血清抗体效价的测定

使用 Cap 重组蛋白免疫小鼠，经过 3 次皮下注射免疫后，眼眶采血并分离血清后测定抗体效价。抗体

效价测定结果见图 1，5 号小鼠血清中 Cap 蛋白的抗体效价 $\geq 10\ 000$ ，选择其进行冲击免疫和细胞融合。

2.2 单克隆抗体的制备及抗体效价测定

通过间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞并进行亚克隆，最终获得 6 株分泌 Cap 蛋白抗体的杂交瘤细胞，分别命名为 2B6、3D4、3F6、4C4、5G4 和 6A7；杂交瘤细胞连续稳定传代，每隔 5 代取细胞培养液检测抗体效价，结果如表 2 所示，单抗效价保持稳定。用单抗细胞分别制备小鼠腹水并测定其效价，效价为 $1 : 1.28 \times 10^5 \sim 1 : 1.28 \times 10^7$ 。

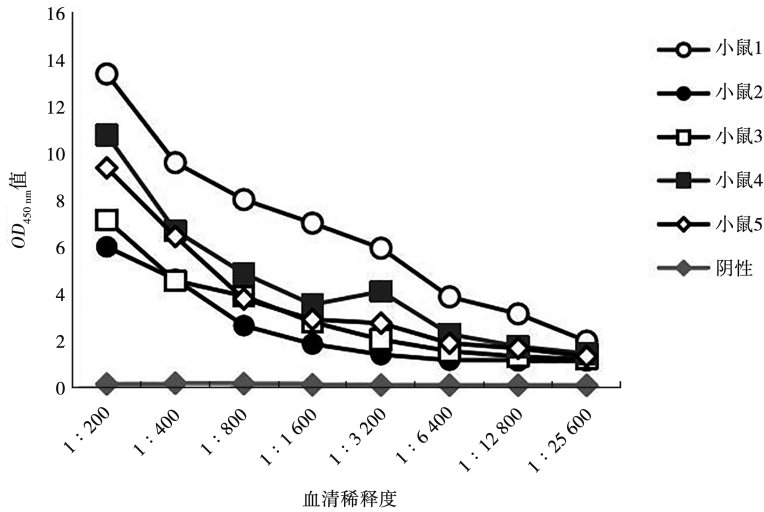


图1 PCV2 Cap 免疫小鼠的血清抗体效价测定

表2 间接 ELISA 测定杂交瘤细胞培养液和小鼠腹水的抗体效价

单抗名称	代次				小鼠腹水 抗体效价
	P5	P10	P15	P20	
2B6	1 : 256 000	1 : 204 800	1 : 409 600	1 : 409 600	1 : 1.64×10 ⁷
3D4	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1.64×10 ⁷
3F6	1 : 25 600	1 : 409 600	1 : 409 600	1 : 204 800	1 : 8.19×10 ⁶
4C4	1 : 102 400	1 : 102 400	1 : 204 800	1 : 102 400	1 : 8.19×10 ⁶
5G4	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 25 600	1 : 25 600	1 : 1.64×10 ⁷
6A7	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 12 800	1 : 1.28×10 ⁵

2.3 单克隆抗体免疫反应特性鉴定

由图2可知,6株单抗都能与Cap重组蛋白发生特异性反应,其中5株也能与PCV2产生特异性反应,而与杆状病毒表达的PRRSV N蛋白和未接毒的PK-15细胞不发生反应。

如图3所示,与未接毒的PK-15细胞相比,所有单抗对PCV2感染的PK-15细胞都有明显的特异性结合,发出清晰可见的绿色荧光。

如图4所示,不具备PCV2中和活性的无关腹水能够非特异性地减少荧光细胞数量,其在1:100倍稀释时,荧光细胞数量与空白对照基本无差异,故所有单抗以此稀释度为基准线(1:1稀释)。PCV2 Cap单抗3E5腹水在1:128倍稀释下,与阴性对照孔比较,能够减少50%荧光细胞数量,表现出显著的中和效果。本试验制备的单克隆抗体2B6和4C4株在1:128倍稀释的情况下,与阴性对照孔比较,

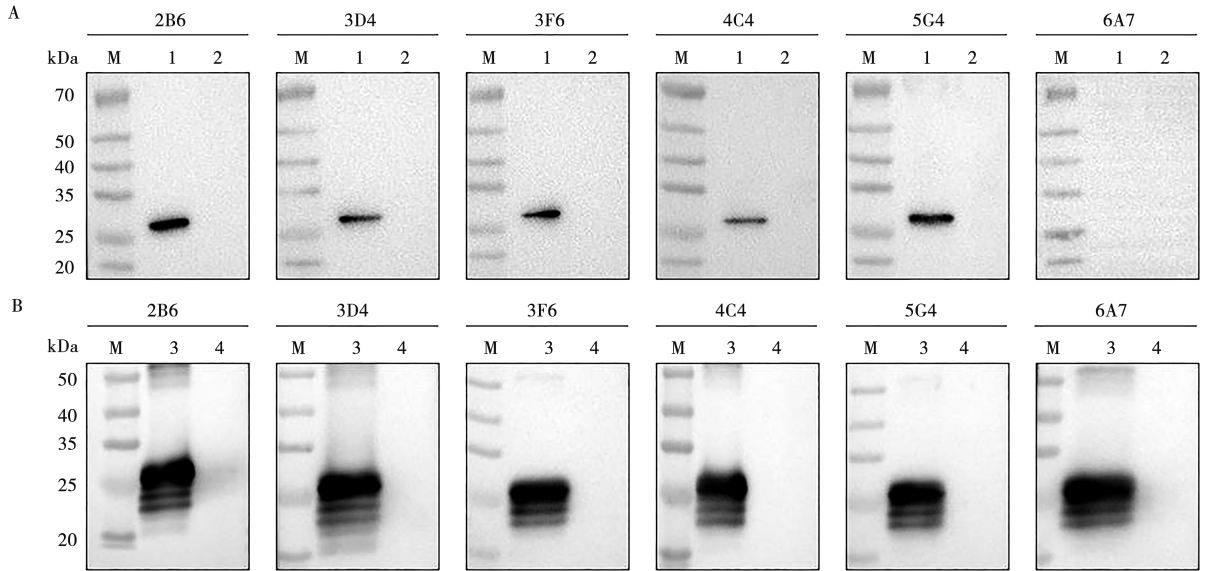
也能够减少50%荧光细胞数量,对PCV2病毒液有中和效果。6A7及其余株在不同稀释度下的荧光细胞数量均与阴性对照孔基本无差异,故判定为不具有中和活性。

2.4 单抗亚类鉴定

单克隆抗体亚型鉴定结果显示,2B6、3D4、3F6、4C4和5G4抗体的重链类型为IgG2a,6A7的重链类型为IgG2b,所有单抗的轻链类型均为Kappa型。

2.5 单抗识别的抗原表位鉴定

使用大肠杆菌表达出Cap基因9个截断体片段,His单抗进行Western blot鉴定,结果表明所有截短片段长度与预期相符(图5)。单抗Western blot结果显示,2B6、3D4、3F6和6A7单抗识别抗原表位²⁰³ENSIYDQDYN²¹²;4C4和5G4单抗识别抗原表位²²³EFNLKDPPLNPK²³⁴。



M. 蛋白 Marker; 1. PCV2 感染细胞样品; 2. 未感染细胞对照; 3. Cap 重组蛋白; 4. PRRSV N 重组蛋白。

图 2 Western blot 鉴定 Cap 重组蛋白单克隆抗体与 PCV2 (A) 和 Cap 重组蛋白 (B) 的反应性

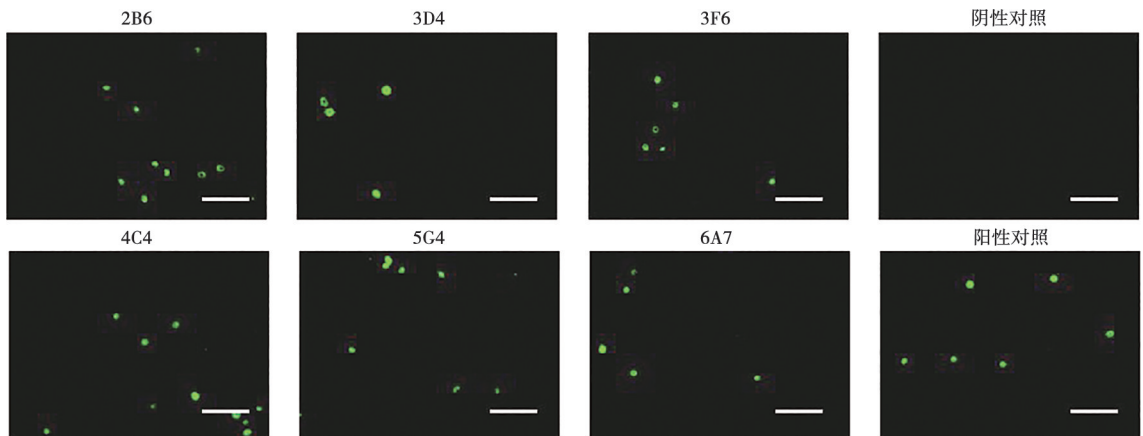


图 3 IFA 鉴定 Cap 单克隆抗体与 PCV2 反应特性 (比例尺 = 200 μm)

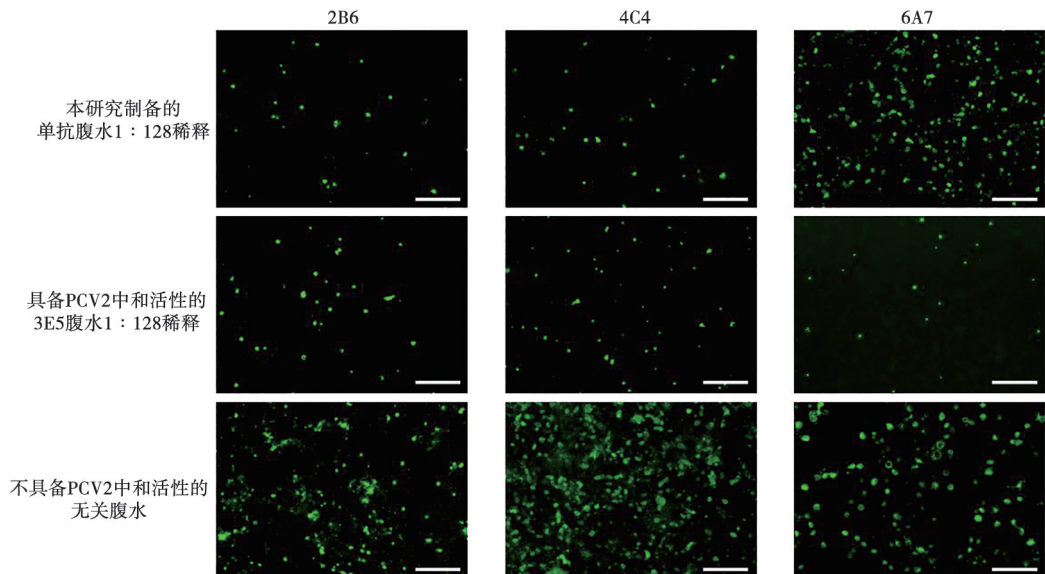
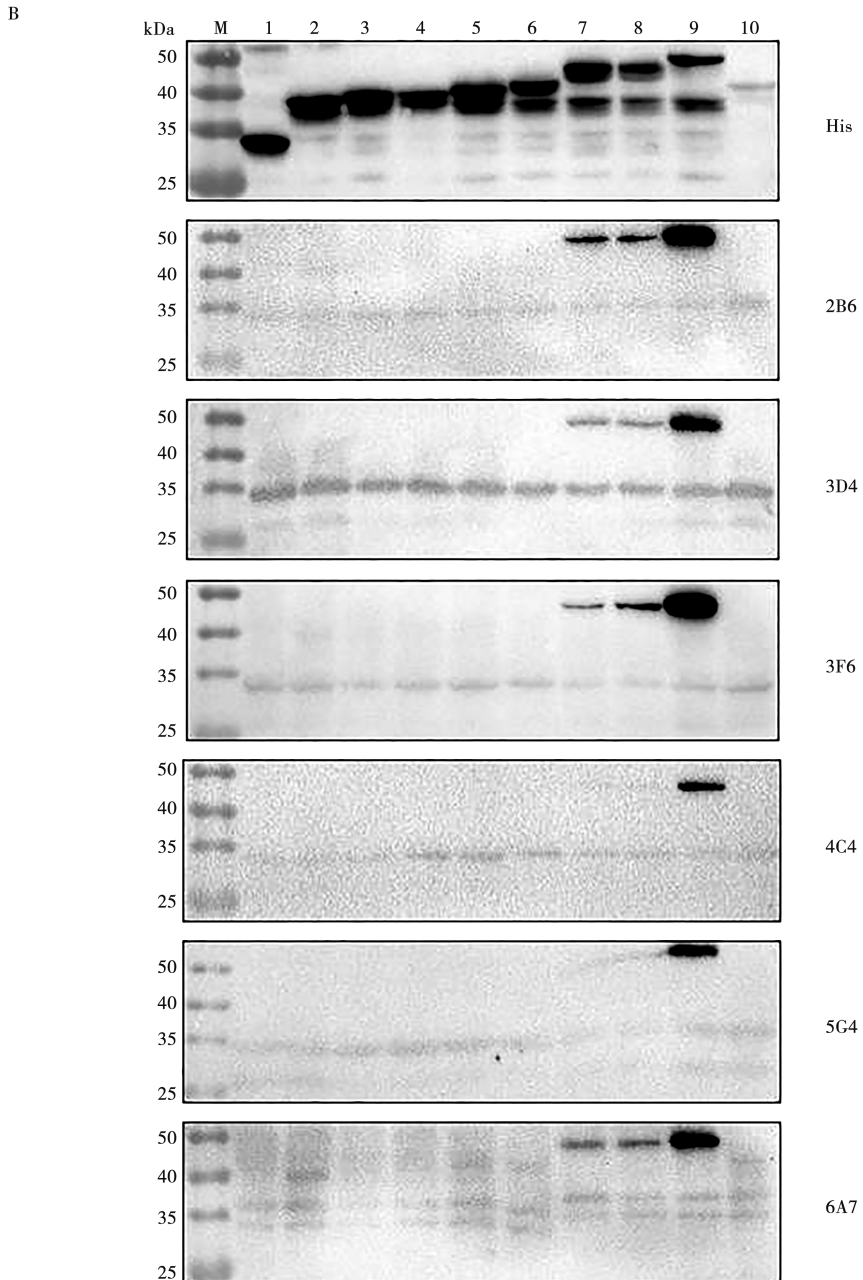
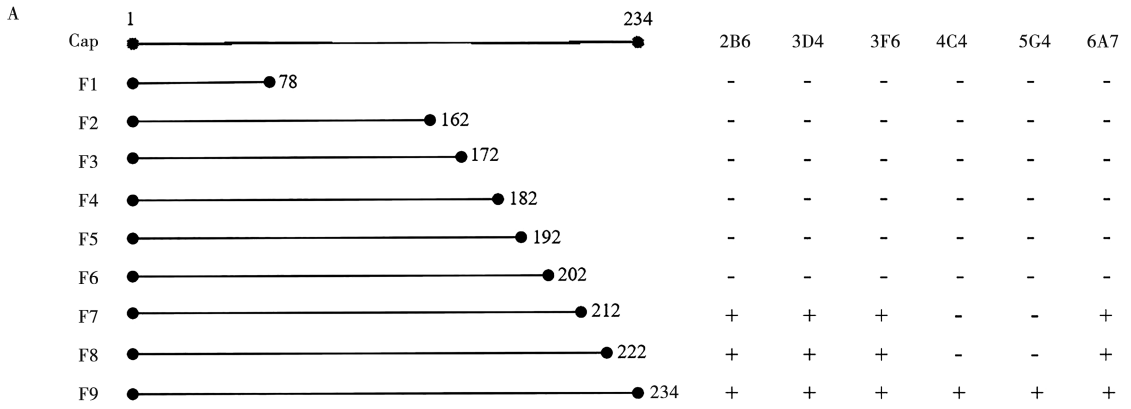


图 4 单克隆抗体中和活性鉴定 (比例尺 = 400 μm)



A. Cap 截短体构建策略；B. Western blot 鉴定结果，1~9 为大肠杆菌表达 Cap 蛋白 F1~F9 截短体；10 为空载诱导全菌蛋白。

图 5 PCV2 Cap 重组蛋白单抗识别抗原表位 Western blot 鉴定

2.6 单抗识别的抗原表位氨基酸位点对比分析

采用 MEGA11 软件对 PCV 不同基因型的 23 个毒株 Cap 序列进行分析, 结果如图 6 所示,²²³EFNLKDP-

PLNPK²³⁴ 在 PCV2b、PCV2c、PCV2d 毒株间保守性较好, 而²⁰³ENSIYDQDYN²¹² 只在 PCV2d 毒株中有较好保守性。

谱系	毒株	2B6、3D4、3F6、6A7			4C4、5G4				
		203	213	223	233	233			
PCV1	PCV2_OKM	RYFTPKPVL	RTIDYLQPN	KRNQLWLR	TTGNVDHVL	GTAFENSIYD	QDYNIRITMY	VQFRBENLKD	PPLNP
	ABP48094.1E..	Q...WFH...H.N	.HT..E.T..	.Y.LQ.AATA	.N.VV.L.I.I....	...K
	ABG48511.1	..L...E..	Q...WFH...H.N	.HT..E.T..	.Y.LQ.AATA	.N.VV.L.I.I....	...K
	AGS41463.1E..	Q...WFH...H.N	.HT..E.T..	.Y.LQ.AATA	.N.VV.L.I.I....	...K
PCV2a	ALZ42081.1S..	F.....M..K..I..T
	AAC35310.1S..	F.....M..A..K..V..	...K
	BAP81716.1S..	F.....M..K..V..	...T
	ATG88289.1S.L.F.M..K..V..V..	...T
PCV2b	ATG88287.1S.V.F.M..K..V..V..	...T
	AEN03320.1S..	F.....M..E..V..	...T
	AAC35331.1S..	F.....M..E..V..	...T
	AGG56659.1S..	F.....M..E..V..	...T
PCV2c	AAV34250.1S..	F.....M..E..V..	...T
	ABX71779.1S..	F.....M..H..Q..TNAA..V..V..	...T
	ABX71781.1S..	F.....M..H..Q..TNAA..V..V..	...T
	ABX71783.1S..	F.....M..H..Q..TNAA..V..V..	...T
PCV2d	QFI57595.1	F.....M..T
	UBT23870.1	F.....M..T
	ABP68620.1	F.....M..K..	...T
	AYA44195.1G..	F.....M..T
PCV2e	AGQ51984.1	F.....M..T
	ALK04314.1	F.....M..T
	ALT45967.1I..	F.....M..PS
	AWF93945.1I..	F.....M..PS

图 6 PCV2 Cap 蛋白抗原表位保守性分析

3 讨论

PCV2 是一种高传染性、能够引起免疫抑制的病毒, 在全球范围内广泛传播, 对猪只的健康和养殖业经济造成了严重影响^[13]。单克隆抗体具有高特异性、高浓度、稳定均一等特性, 在生物医学、疾病诊断等领域普遍应用^[14]。PCV2 单抗研究比较多, 包括 Cap 和 Rep 单克隆抗体, 多用于探究相应的 B 细胞抗原表位或建立 PCV2 特异性检测诊断方法。Lekcharoensuk 等^[15] 使用嵌合 PCV1/PCV2 感染性克隆, 研制了 7 株单抗, 并在 PCV2 Cap 蛋白第 47~85、165~200 和 230~233 氨基酸残基中鉴定出至少 5 个重叠的构象表位。Hung 等^[16] 研制了 2 株单抗 (3H11 和 6H11) 可识别 PCV2 Cap 蛋白 C 端 205~233 氨基酸残基。Shang 等^[17] 研制了 16 株单抗, 使用合成多肽 ELISA 方法, 发现²³¹LNP²³³ 缺失会导致 213~233 短肽的抗原性丧失, 表明²³¹LNP²³³ 是该表位的核心基序, 且第 233 位脯氨酸 (²³³Pro) 是 PCV1 和 PCV2 的关键特异性残基。Wang 等^[18] 研制了 4 株针对 PCV3 Cap 的单克隆抗体, 使用 7E3 株单抗鉴定出一种新型 B 细胞表位¹¹⁰DLDGAW¹¹⁵, 并成功建立了 PCV3 Cap 蛋白阻断 ELISA 抗体检测方法。郭振光^[19] 使用 Cap 重组蛋白研制出 2 株单抗, 并建立了检测 PCV2 Cap 抗体的间接 ELISA 方法。郝俊芳等^[20] 使用实验室制备的针对 PCV2 Cap 蛋白的 6A5 株单抗, 建

立了亲和肽双抗体夹心 ELISA 检测方法, 具有良好的特异性、灵敏性。本研究使用杆状病毒表达的重组 Cap 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 成功制备出 6 株稳定分泌抗体的 Cap 单克隆抗体 (2B6、3D4、3F6、4C4、5G4 及 6A7), 单抗腹水效价最高达 1 : 1.28 × 10⁷。其中 6 株单抗与 PCV2 具有 IFA 反应特性。Western blot 证实, 5 株单抗 (2B6、3D4、3F6、4C4 及 5G4) 能够特异性识别 PCV2, 2 株单抗 (2B6 和 4C4) 具有 PCV2 中和活性, 为 PCV2 检测和研究提供了有用的生物材料。

PCV2 Cap 蛋白具有重要免疫原性。昆虫细胞中表达的 Cap 重组蛋白能够自组装形成病毒样颗粒^[6], 诱导宿主产生强烈的抗体反应。PCV2 中和抗体可识别病毒表面抗原 (主要为 Cap 蛋白), 阻止病毒与宿主细胞表面的受体结合, 限制病毒感染和传播^[21]。PCV2 中和抗体水平与疫苗免疫保护作用直接相关^[22]。中和抗体还能作为免疫记忆的一部分, 提供长期的免疫保护。PCV2 中和抗原表位尚不十分清楚。Mo 等^[8] 通过冷冻电镜技术, 观察到具有中和活性单抗 3H11 Fab 的 CDR 区域与位于 PCV2 VLP 表面的 EF 环区域结合 (¹³⁴KATALT¹³⁹), 表明¹³⁴KATALT¹³⁹ 可能是 PCV2 中和抗原表位。Liu 等^[23] 研究表明, PCV2 Cap 蛋白第 59 和 60 位氨基酸参与构象中和表位的形成, 对单抗 8E4 的中和能力起重要作用。翟淑燕等^[24] 报道, 3E5 中和单抗针对的抗

原表位为非线性抗原表位, N端42~50位氨基酸发挥关键作用。因此, 中和抗原表位可能为保护性线性表位或非线性表位。本研究6株单抗识别抗原表位鉴定结果显示, 2B6、3D4、3F6和6A7单抗识别表位为²⁰³ENSIYDQDYN²¹², 该表位在PCV2b、PCV2c、PCV2d毒株间保守性较好, 4C4和5G4单抗识别表位为²²³EFNLKDPPLNPK²³⁴, 该表位只在PCV2d毒株中有较好保守性。根据抗原表位保守性分析结果, 可利用²⁰³ENSIYDQDYN²¹²表位开发针对多种PCV2亚型的广谱疫苗, 提高疫苗对病毒变异株的保护效果。可综合使用2种表位作为抗原靶点, 建立鉴别不同PCV2亚型的检测方法, 实现快速区分PCV2b/PCV2d及PCV2d的特异性检测。根据中和活性的鉴定结果, 仅2B6和4C4单抗具有PCV2中和活性。针对同一抗原表位的单克隆抗体却表现出不同的中和活性, 可能与单抗亲和力有关, 亲和力高的单克隆抗体将表现出更好的中和活性。不同单抗发挥中和活性的机制可能存在差异, 很多中和单抗识别的抗原表位为非线性表位。该研究鉴定出的2个抗原表位可能是PCV2 Cap中和表位的重要组成部分, 可为PCV2疫苗抗原分子设计提供理论依据。

参考文献:

- [1] OPRIESSNIG T, KARUPPANNAN A K, CASTRO A M M G, et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges [J]. *Virus Res*, 2020, 286: 198044.
- [2] ZHANG HH, HU W Q, LI J Y, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan Province, China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (3): 1057-1061.
- [3] LV Q Z, GUO K K, ZHANG Y M. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2 [J]. *Virus Genes*, 2014, 49 (1): 1-10.
- [4] WANG W, SUN W, CAO L, et al. An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in cattle in Shandong Province, China [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 60.
- [5] HAMEL A L, LIN L L, SACHVIE C, et al. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus [J]. *Can J Vet Res*, 2000, 64 (1): 44-52.
- [6] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (Pt 9): 2281-2287.
- [7] YIN S, SUN S, YANG S, et al. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli* [J]. *Virol J*, 2010, 7: 166.
- [8] MO X, LI X, YIN B, et al. Structural roles of PCV2 capsid protein N-terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type-specific neutralizing epitope [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15 (3): e1007562.
- [9] FAN H, JU C, TONG T, et al. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells [J]. *Vet Res Commun*, 2007, 31 (4): 487-496.
- [10] 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.
- [11] 聂佳婷. 抗猪圆环病毒 3 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备和抗原表位鉴定 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2024.
- [12] 张英婕, 周文锋, 邹亚文, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2024, 54 (2): 217-225.
- [13] MADEC F, ROSE N, GRASLAND B, et al. Post-weaning multi-systemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55 (7): 273-283.
- [14] 刘曦. 单克隆抗体的制备现状及应用前景 [J]. *化工设计通讯*, 2016, 42 (4): 200.
- [15] LEKCHAROENSUK P, MOROZOV I, PAUL P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2 [J]. *J Virol*, 2004, 78 (15): 8135-8145.
- [16] HUNG L C. Carboxyl-terminal decoy epitopes in the capsid protein of porcine circovirus type 2 are immunogenicity-enhancers that elicit predominantly specific antibodies in non-vaccinated pigs [J]. *Viruses*, 2022, 14 (11): 2373.
- [17] SHANG S B, JIN Y L, JIANG X T, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2 [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46 (3): 327-334.
- [18] WANG J, LEI B, ZHANG W, et al. Preparation of monoclonal antibodies against the capsid protein and development of an epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the antibody against porcine circovirus 3 [J]. *Animals*, 2024, 14 (2): 235.
- [19] 郭振光. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的原核表达及其在 PCV2 抗体检测 ELISA 方法建立和单克隆抗体制备中的应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [20] 郝俊芳, 黄凯, 崔艳艳, 等. 猪圆环病毒 2 型亲和肽双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及验证 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53 (11): 1371-1376.
- [21] DARWICH L, MATEU E. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. *Virus Res*, 2012, 164 (1/2): 61-67.
- [22] MEERTS P, VAN GUCHT S, COX E, et al. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication [J]. *Viral Immunol*, 2005, 18 (2): 333-341.
- [23] LIU J, HUANG L, WEI Y, et al. Amino acid mutations in the capsid protein produce novel porcine circovirus type 2 neutralizing epitopes [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 165 (3/4): 260-267.
- [24] 翟淑燕, 陈兴慧, 白娟, 等. 猪圆环病毒 2 型单克隆抗体研制与夹心 ELISA 抗原检测方法的建立 [C] // 动物生态养殖、疫病防控、食品安全与人类健康: 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集. 徐州: 中国畜牧兽医学会, 2013: 322.