

南非2型口蹄疫病毒VP1蛋白单抗的制备与特性研究



开放科学
(OSID)

朱昱茜^{1,2}, 石正旺², 罗俊聪², 陈婕², 林永玉^{1,2}, 席韬², 张帆²,
石鑫泰², 郑海学^{1,2*}, 包世俊^{1*}, 田宏^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要:为制备南非2型口蹄疫病毒型特异性单克隆抗体,本研究通过原核系统表达南非2型口蹄疫病毒VP1蛋白,亲和层析的方法纯化目的蛋白。将纯化的VP1蛋白使用弗氏佐剂乳化后,免疫BALB/c小鼠,待加强免疫后取血清效价最稳定的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,应用间接ELISA筛选针对南非2型VP1蛋白的单克隆抗体。采用特异性试验、叠加试验和抗体亚型鉴定等方法对筛选的单克隆抗体特性进行分析。结果发现,本研究成功表达南非2型VP1蛋白,筛选出2株能稳定分泌特异性针对南非2型VP1蛋白的杂交瘤细胞株(3B2和6F2),其亚型分别为IgG2a和IgG1,叠加试验结果表明2株单抗的叠加系数>40%,说明两株单抗针对不同的抗原位点;单抗的效价可达1:256 000,特异性试验证明2株单抗均不与O型、A型口蹄疫病毒及其他常见猪病病毒产生交叉反应。由此可见,本研究制备的单克隆抗体具有良好的特异性和反应性,为南非2型口蹄疫病毒定型诊断和未来疫苗的研制奠定了基础。

关键词:南非2型;口蹄疫病毒;VP1蛋白;特异性单克隆抗体

中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-8721(2024)04-0794-08

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004493

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的牛、羊、猪等偶蹄类动物水泡性疾病,具有高度传染性,对养殖业造成极大的危害和严重的经济损失^[1,2],是世界各国最关注的传染病之一。FMDV属于小核糖核酸病毒科,FMDV属,是单股正链RNA病毒,突变率高,传播速度快^[3,4]。因此,世界动物卫生组织(World organization for animal health, WOAH)将其列为必须上报的A类传染病,我国将

其列为一类动物疫病。

FMDV共有7种血清型,即O型、A型、C型、亚洲1型(Asia1)、南非1型(Southern African Territories 1, SAT1)、南非2型(SAT2)和南非3型(SAT3),且各血清型之间无交叉保护力^[5,6]。研究发现,O型和A型流行区域最广,Asia1型主要在中东和南亚地区流行,C型自2004年在巴西和肯尼亚引发疫情之后再未见报道,SAT1、SAT2和SAT3主要在撒哈拉以南的非洲大陆流行^[7,8]。WOAH近几年的数据显示,世界范围内流行的FMDV都含有SAT2型^[9]。近年来SAT2 FMD从非洲蔓延至中东、西亚地区,表现出跨区域传播的趋势^[10]。自2023年以来,伊拉克报道的SAT2 FMD暴发数量和临床案例明显增加,临近的科威特和伊朗边境也有疫情出现。而引起SAT2 FMD疫情的毒株为拓扑型XIV,与来自埃塞俄比亚的SAT2毒株密切相关,该毒株可引起水牛和其它牛群出现严重的临床症状^[11,12]。除此之外,约旦和土耳其也先后发生了SAT2 FMD疫情^[13]。而中东国家的伊朗与伊拉克、土耳其接壤,受感染风险极高。随着宗教文化、政治经济以及我国同周边国家经济贸易往来不断加深,假如SAT2 FMD在伊朗暴发,并在阿富汗、巴基斯坦和印度等国家流行,这将可能通过以下2种途径

收稿日期:2023-11-14; **接受日期:**2024-02-01

基金项目:科技部国家重点研发计划项目(项目号:2021YFD1800300),题目:口蹄疫病毒的分子流行病学与传播机制;科技重大专项-国家重点实验室重组项目(项目号:22ZD6NA001),题目:家畜重要疫病感染与免疫防控的基础理论研究;2022年甘肃省创新联合体项目(项目号:22ZD6NA012),题目:家畜重要疫病诊断研制与产业化;十四五广东省揭榜挂帅项目(项目号:2023SDZG02),题目:重大动物疫病新型综合防控技术;国家生猪技术创新中心先导科技项目(项目号:NCTIP-XD/C03),题目:疾病与生物安全防控创新团队基本建设任务。

作者简介:朱昱茜(1990-),女,从事动物疫病诊断技术研究,Email:912320569@qq.com

***通信作者:**郑海学(1979-),男,研究员,从事动物传染病学与流行病学研究,Email:zhenghaixue@caas.cn;包世俊(1970-),男,教授,从事动物传染病学及兽医病原分子生物学研究,Email:bsjdy@126.com;田宏(1976-),女,研究员,从事动物病毒分子生物学及疫病诊断技术研究,Email:xibeitian0931@163.com

威胁到我国的养殖业,第一种途径:FMD在巴基斯坦暴发,巴基斯坦的牛羊从新疆方向输入我国,可直接对国内养殖业产生威胁;第二种途径:如果SAT2 FMD突破南亚屏障,通过印度传入我国,也可直接对国内养殖业产生威胁。因此,在无疫苗保护的情况下,为严防SAT2 FMDV传入我国,建立SAT2 FMDV检测方法作为进出口岸检疫和防控的技术储备至关重要。

FMDV为无囊膜的病毒,基因组全长约8.5 kb,包含4种结构蛋白VP1、VP2、VP3和VP4。其中,VP1蛋白位于病毒表面,是病毒吸附、穿入和复制的关键衣壳蛋白,在病毒对抗宿主免疫系统功能时发挥重要作用,含有FMDV重要的抗原位点,也是FMDV变异的关键蛋白,对疫苗研发、疾病监测和流行病学调查具有重要意义^[14,15]。本研究通过原核表达SAT2 FMDV VP1蛋白,免疫小鼠制备型特异性单克隆抗体(Monoclonal antibody, MAb),并鉴定其特性,旨在为SAT2 FMD诊断方法的建立提供关键支撑材料,为边境地区的SAT2 FMD疫情监测与预警提供保障。

材料与方法

1 细胞、实验动物及试剂

大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,购自北京全式金生物科技有限公司;SPF级BALB/c小鼠(7周龄),购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心,动物实验方案严格遵守相关实验动物福利规定,并获得中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(LVRIAEC-2023-054);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HT、HAT、HRP标记的山羊抗鼠IgG以及PEG等试剂,购自Sigma公司;小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学团队保存;单抗亚型鉴定试剂盒,购自protein公司;胎牛血清,购自Gibco公司;FMD A型病毒(A/GDMM/2013)、FMD O型病毒(O/BY/2010)和塞内卡病毒(SVA-CH-FJ-2017)灭活抗原均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室提供。

2 SAT2-VP1重组蛋白的表达鉴定

从GenBank数据库中(登录号:AF367126.1)下载SAT2-VP1基因序列,送武汉金开瑞生物工程有限公司进行合成,并构建至pET-28a载体中,命名为

pET-28a-SAT2-VP1。将pET-28a-SAT2-VP1重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞,在IPTG浓度为1 mmol/L,温度为16℃的条件下诱导过夜。离心收集菌体,加入PBS洗涤2次,使用超声破碎仪处理菌体,离心后分别收取上清液和沉淀制备样品,按比例加入5×loading buffer制备样品,用SDS-PAGE电泳分析重组蛋白的可溶性。

3 SAT2-VP1重组蛋白的纯化

将收集到的菌体用包涵体缓冲液A(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl溶液),缓冲液B(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、1% NP-40溶液)和缓冲液I(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、0.5% TritonX-100、4 mol/L 脲素溶液)反复超声洗涤并收集相应的上清液,最后沉淀溶解于缓冲液C(8 mol/L 脲素、10 mmol/L β-巯基乙醇、100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 mmol/L EDTA、2 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液),并于4℃条件下置于梯度降低浓度的不同脲素溶液中进行透析,将透析后的蛋白溶液加入平衡液平衡后的Ni柱中结合3~5 min,用100 mmol/L咪唑洗杂5次,150 mmol/L咪唑洗杂5次,最后用250 mmol/L咪唑洗脱目的蛋白。取收集的各个样品并按比例加入5×loading buffer,通过SDS-PAGE分析蛋白的纯度,利用His Tag MAb以及重组蛋白免疫的兔抗血清验证蛋白的表达。

4 小鼠免疫

取5只7周龄雄性BALB/c小鼠免疫制备抗体。首次免疫时将纯化的SAT2-VP1蛋白与弗氏完全佐剂等体积乳化,蛋白免疫剂量为每只50 μg,通过背部皮下分点注射方式免疫小鼠。每2周免疫1次,第2次和第3次免疫使用弗氏不完全佐剂进行乳化,方式同第一次。第3次免疫10 d后,使用尾静脉采血法采血,离心分离血清,用间接ELISA方法检测血清效价,并对小鼠进行腹腔注射SAT2-VP1蛋白加强免疫。

5 杂交瘤细胞融合筛选及腹水制备纯化

将加强免疫后的小鼠安乐死后取其脾脏置于1640不完全培养基中,利用注射器吹洗出细胞后离心收集备用,将收集好的脾细胞制备成细胞悬液与SP2/0混合,加入PEG作为促溶剂进行细胞融合,融合完成后加入1640培养基终止融合,离心收集细胞,用HAT培养基重悬后铺于96孔板中,置于CO₂浓度为5%的37℃培养箱中培养7 d,取细胞上清,

应用间接ELISA方法筛选出抗体阳性孔。使用HT培养基按有限稀释法进行2~3次亚克隆,直至ELISA检测阳性率达100%为止,通过以上方法最终筛选出2株能稳定分泌抗体的细胞株(3B2和6F2),将其扩大培养并保种。取10只Balb/c小鼠,每只腹腔提前注射弗氏不完全佐剂500 μ L,7 d后腹腔注射杂交瘤细胞悬液,每只腹腔注射500 μ L约含 1×10^6 个细胞,待小鼠腹部隆起后采集腹水,离心后收集上清,用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体。

6 单克隆抗体效价检测

利用间接ELISA方法检测抗体效价,将纯化的SAT2-VP1蛋白以100 ng/孔包被酶标板。用PBST将纯化的MAb从1:2 000开始连续2倍倍比稀释至1:256 000,用SP2/0腹水作为阴性对照,稀释比例同MAb,转至酶标板,37℃反应30 min。PBST洗涤5次,加入用PBST 1:15 000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠的IgG,37℃反应30 min。PBST洗涤5次,加入TMB显色,2 M H_2SO_4 终止反应,酶标仪读取OD₄₅₀值。计算MAb(S)与SP2/0(N)腹水的比值,以S/N>2.1所对应的最大稀释比例作为MAb的效价。

7 单克隆抗体亚型鉴定

亚型鉴定根据试剂盒说明书进行操作。

8 单克隆抗体叠加实验

为确定MAb识别抗原表位是否一致,将抗体稀释利用间接ELISA叠加试验。按照公式计算MAb组合的叠加系数(Additivity index, AI), $AI = (2 * A_{(1+2)} / (A_1 + A_2) - 1) * 100$,其中 A_1 、 A_2 和 $A_{(1+2)}$ 分别为3B2、6F2和3B2叠加6F2分别进行间接ELISA的OD₄₅₀值,当叠加系数AI>40%时,判定两株MAb识别不同的抗原位点。

9 单克隆抗体特异性鉴定

按间接ELISA原理,分别以SAT1、SAT2和SAT3的VP1蛋白及FMD O(O/BY/2010)型、FMD A(A/GDMM/2013)型和SVA(SVA-CH-FJ-2017)灭活抗原包被酶标反应板进行检测,验证两株抗体的特异性。

结 果

1 SAT2-VP1重组蛋白的表达和鉴定

将重组的质粒转化至BL21(DE3)细胞,加入IPTG诱导表达后收集菌体,加入PBS超声破碎,离心收取上清和沉淀,以未加IPTG的菌液作对照,制

备样品。SDS-PAGE结果显示,在约30 kDa处有明显的目的条带,与预期大小相符,且SAT2-VP1蛋白以包涵体的形式存在(图1)。

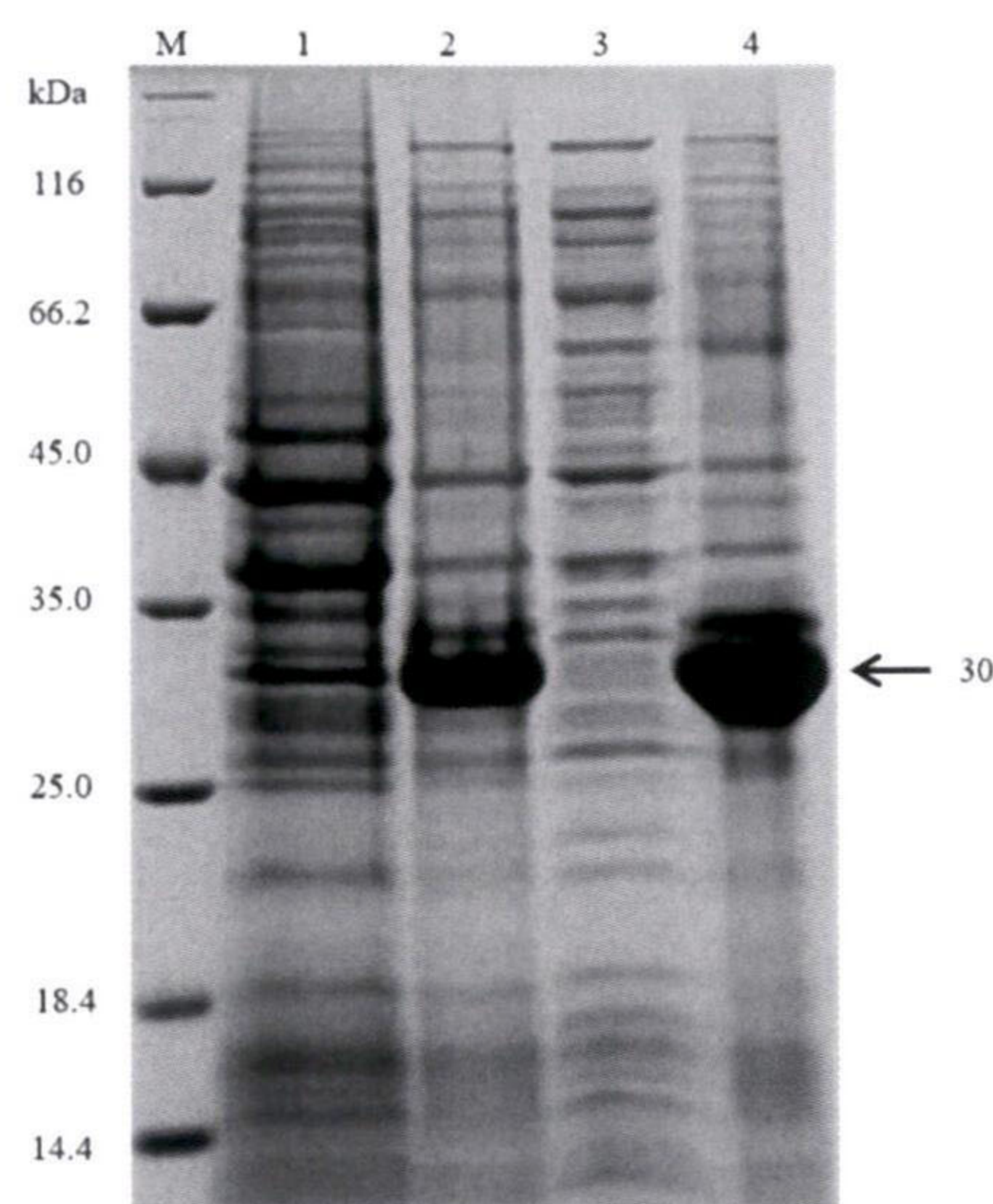


图1 SAT2-VP1重组蛋白的表达鉴定

注:M.蛋白质Marker;1.未诱导菌液;2.诱导后全菌;3.诱导后超声上清;4.诱导后超声沉淀

Figure 1 Expression of the recombinant protein of SAT2-VP1

Notes:M,protein marker; 1.no induced bacterial solution; 2.whole bacteria after induction; 3.ultrasonic supernatant after induction; 4. ultrasonic precipitation after induction.

2 SAT2-VP1重组蛋白的纯化

收集诱导后的菌体进行超声处理(图2A),通过SDS-PAGE确定蛋白的纯度,结果发现纯化获得的目的蛋白具有较高的纯度(图2B)。通过Western blot试验,利用His Tag MAb和兔多抗血清验证蛋白的表达,可见30 kDa处有明显的特异性条带,表明成功纯化SAT2-VP1重组蛋白(图2C)。

3 免疫小鼠抗体水平检测

利用纯化的SAT2-VP1蛋白免疫小鼠,每次免疫前尾静脉采血并离心分离血清,待三次免疫后采用间接ELISA方法检测血清效价,结果发现血清稀释比例在1:64 000时,小鼠的阳性血清OD₄₅₀值/阴性血清OD₄₅₀值仍大于2.1,其中5#小鼠相较其他小鼠稳定,因此选用5#小鼠进行试验(图3)。

4 单克隆抗体阳性孔的筛选

MAb阳性孔的筛选检测数据见表1,利用间接ELISA方法,经三次亚克隆后检测阳性率达100%。选取OD₄₅₀最大值的细胞株扩大培养,并将稳定分泌抗体的细胞株注射小鼠腹腔制备腹水并保存细胞株。

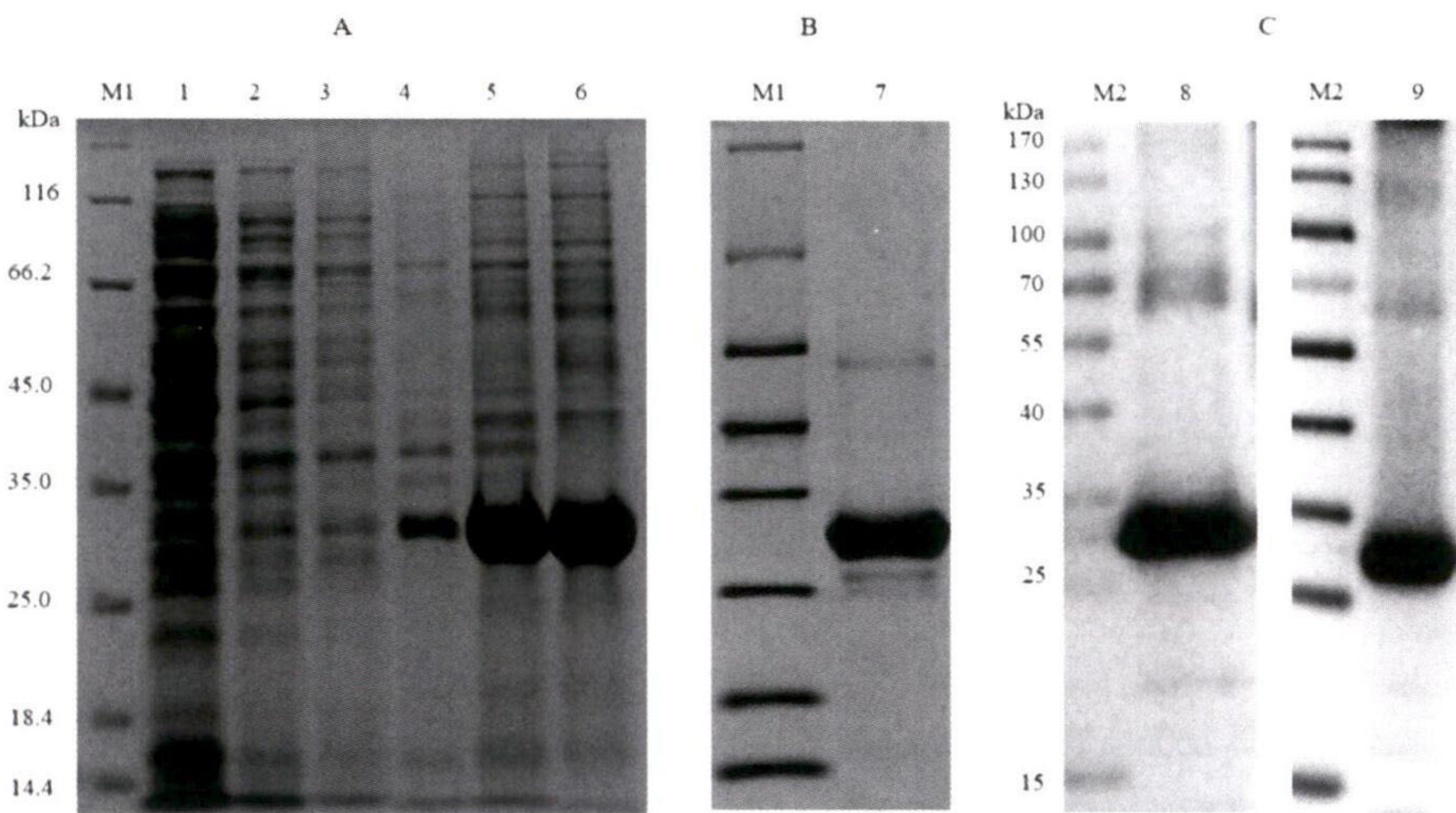


图2 SAT2-VP1重组蛋白的纯化与鉴定

注:A. M1.蛋白质Marker;1,2.缓冲液A的超声上清;3,4.缓冲液B的超声上清;5.缓冲液I超声上清;6.缓冲液C溶解包涵体;B. SDS-PAGE分析纯化的SAT2-VP1重组蛋白;M1.蛋白质Marker;7.纯化的重组蛋白;C. Western blot分析纯化的SAT2-VP1重组蛋白;M2.蛋白质Marker;8.His Tag鉴定纯化的重组蛋白;9.兔多抗血清鉴定重组蛋白

Figure 2 Purification and characterization of the recombinant protein of SAT2-VP1

Notes:A. M1. protein marker; 1 and 2. ultrasonic supernatant of buffer A; 3 and 4. ultrasonic supernatant of buffer B; 5. ultrasonic supernatant of buffer I; 6. buffer C solubilized inclusion bodies;B. SDS-PAGE of the purified recombinant protein of SAT2-VP1; M1. protein marker; 7. purified recombinant protein;C. Western blot of the purified recombinant protein of SAT2-VP1; M2. protein marker; 8. purified recombinant proteins identified by His Tag; 9. rabbit polyanterum-identified recombinant protein

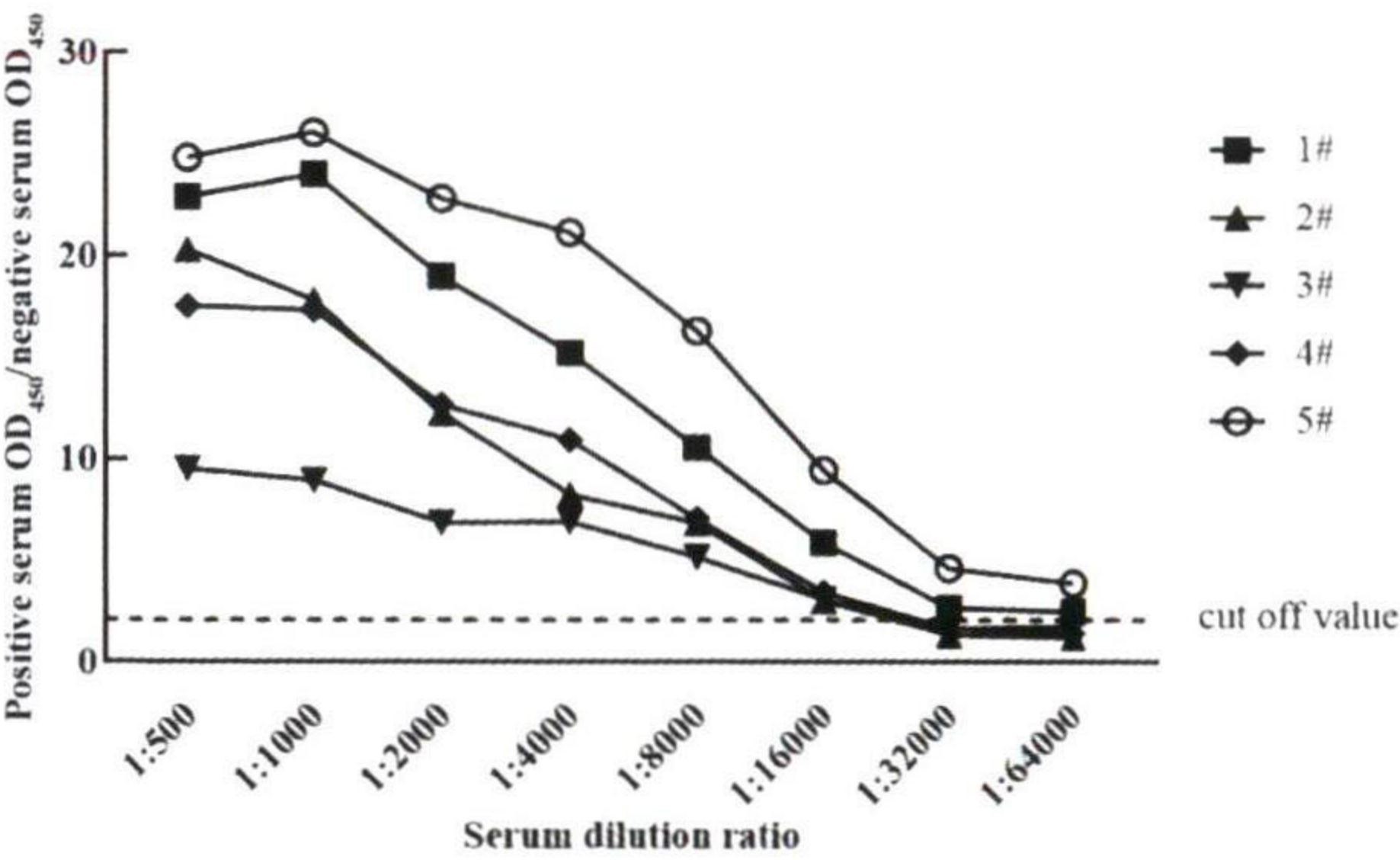


图3 SAT2-VP1重组蛋白免疫血清效价检测

Figure 3 Serum titer of the recombinant protein of SAT2-VP1

5 单克隆抗体效价检测

利用间接ELISA方法检测抗体效价。结果发现在抗体稀释比例达1:256 000时,3B2和6F2两株单抗的S/N值均>2.1(图4),说明制备的MAb具有较高的反应性。

6 单克隆抗体叠加实验

MAb叠加实验数据见表2和图5,发现3B2和6F2两株抗体的叠加系数>40%,判定两株MAb识别不同的抗原位点。

表1 ELISA方法筛选MAb阳性孔的试验结果

Table 1 Results of ELISA for screening Mab-positive pores

MAb (hole)	3B2			6F2		
	Number of subclones					
	1	2	3	1	2	3
1	0.782	1.883	2.038	0.061	2.202	2.383
2	2.008	0.215	1.71	2.281	0.261	1.982
3	1.213	1.825	1.675	2.01	1.759	0.925
4	1.752	0.069	1.79	0.072	0.067	1.052
5	0.321	1.985	2.022	0.071	0.145	1.12
6	0.068	1.609	1.179	0.092	2.16	2.121
7	0.967	1.972	1.511	2.054	0.072	2.332
8	0.069	0.113	1.654	0.06	0.068	2.165
9	0.092	1.058	2.14	0.063	1.973	1.839
Negative	0.088	0.08	0.091	0.079	0.095	0.082

7 单克隆抗体亚型鉴定

利用试剂盒检测MAb的亚型(图6),单抗6F2重链为IgG2a,轻链为Kappa链;单抗3B2重链为IgG1,轻链为Kappa链。

8 单克隆抗体的特异性检测

抗体特异性检测结果(图7),制备的MAb 3B2和6F2与SAT2-VP1蛋白均有良好的反应性,且与其他血清型(FMD SAT1型和SAT3型VP1蛋白、

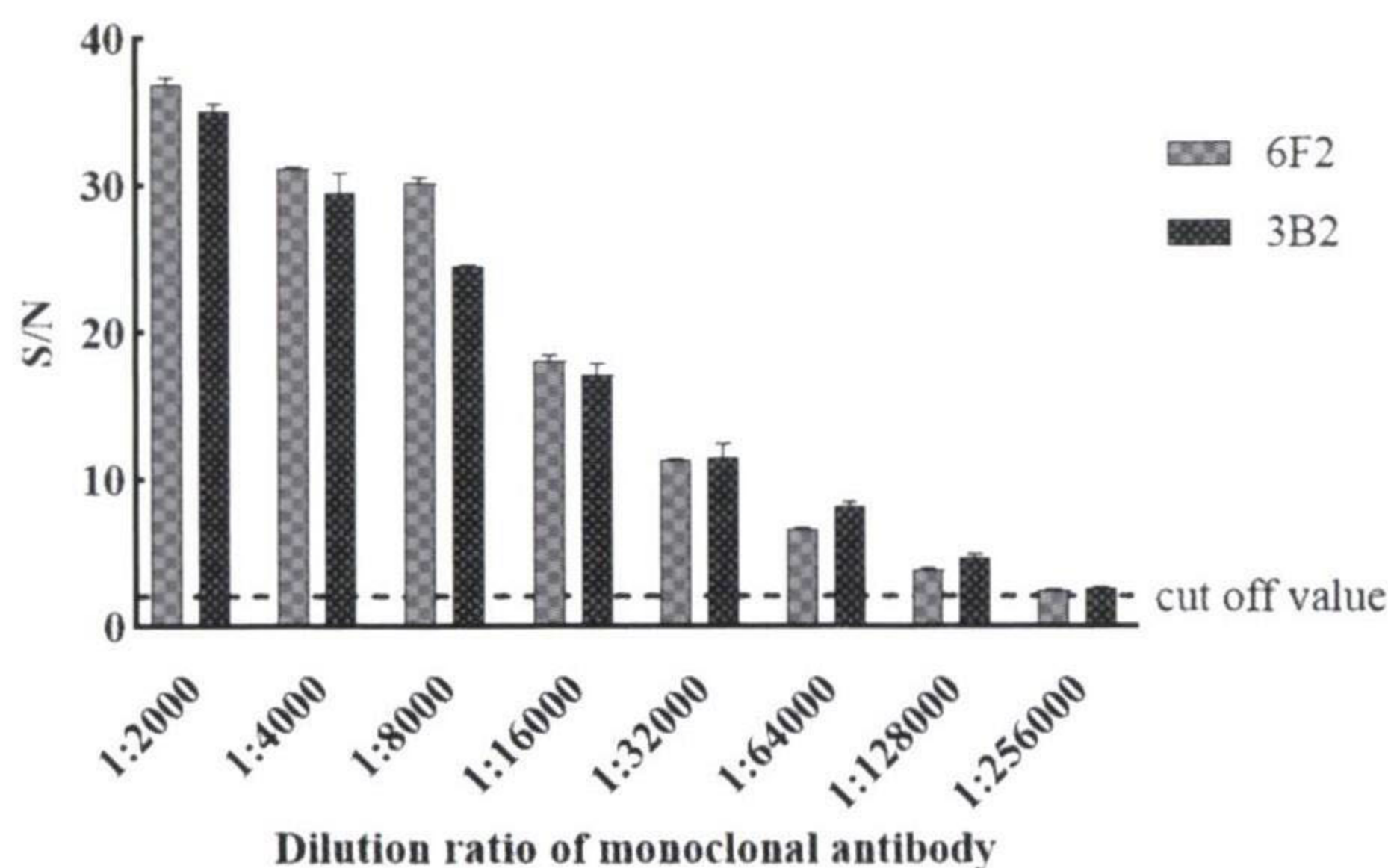


图 4 单克隆抗体效价检测

Figure 4 Titer detection of monoclonal antibodies

表 2 ELISA 叠加分析 2 株 MAb 叠加试验的结果

Table 2 The results of MAb-superimposed test of two strains analyzed by ELISA

MAb	OD ₄₅₀ value			AI(%)
		Mean value	3B2+6F2	
3B2 (A ₁)	1.558	1.563	1.561	42.9
6F2 (A ₂)	1.407	1.392	1.400	
3B2+6F2 (A ₍₁₊₂₎)	2.136	2.096	2.116	

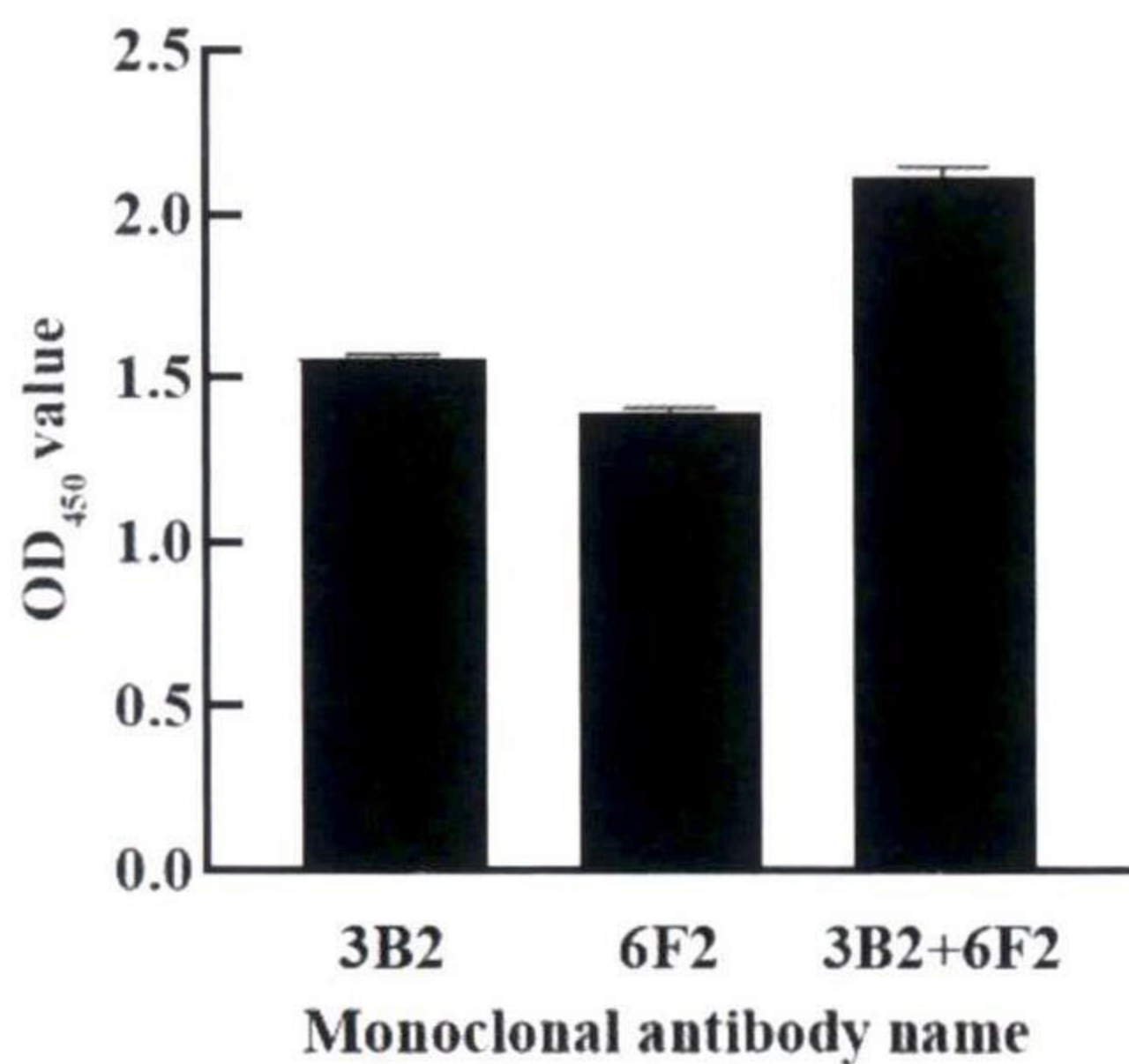


图 5 单克隆抗体叠加试验

Figure 5 Superposition of the monoclonal antibody test

FMD O 型、FMD A 型以及 SVA 灭活抗原)无反应,说明制备的两株单抗具有良好的特异性。

讨 论

FMD 是一种可对养殖业造成巨大伤害的家畜疾病,可以远距离传播感染家畜,且短时间内可在无 FMD 地区引起急性流行病^[16,17]。我国将 FMD 归为严格控制 and 强制免疫的一类动物疫病,FMD 的多态性和变异性给防控带来很大的困难。在 SAT2 血清

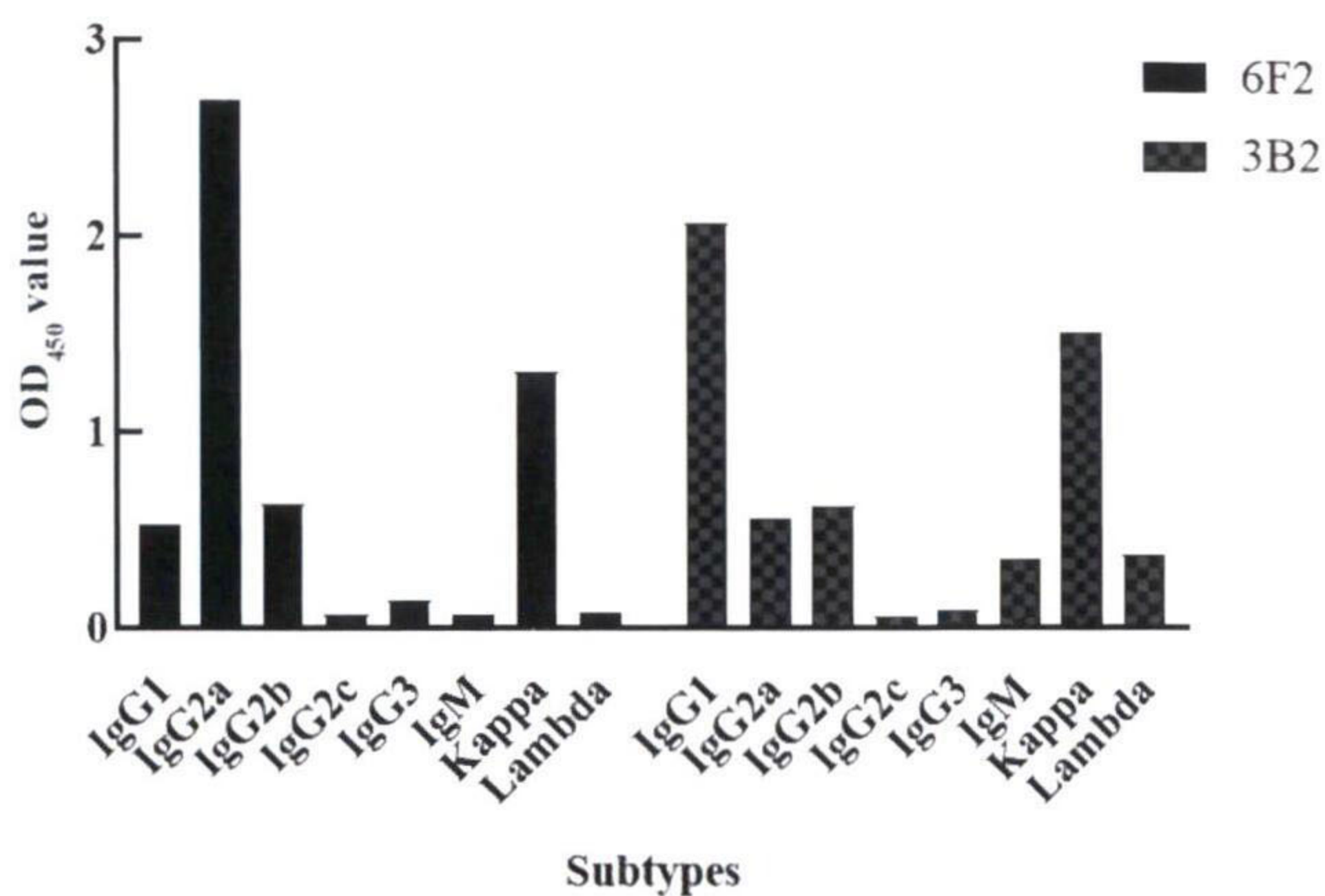


图 6 MAb 亚型的鉴定

Figure 6 Identification of MAb subtypes

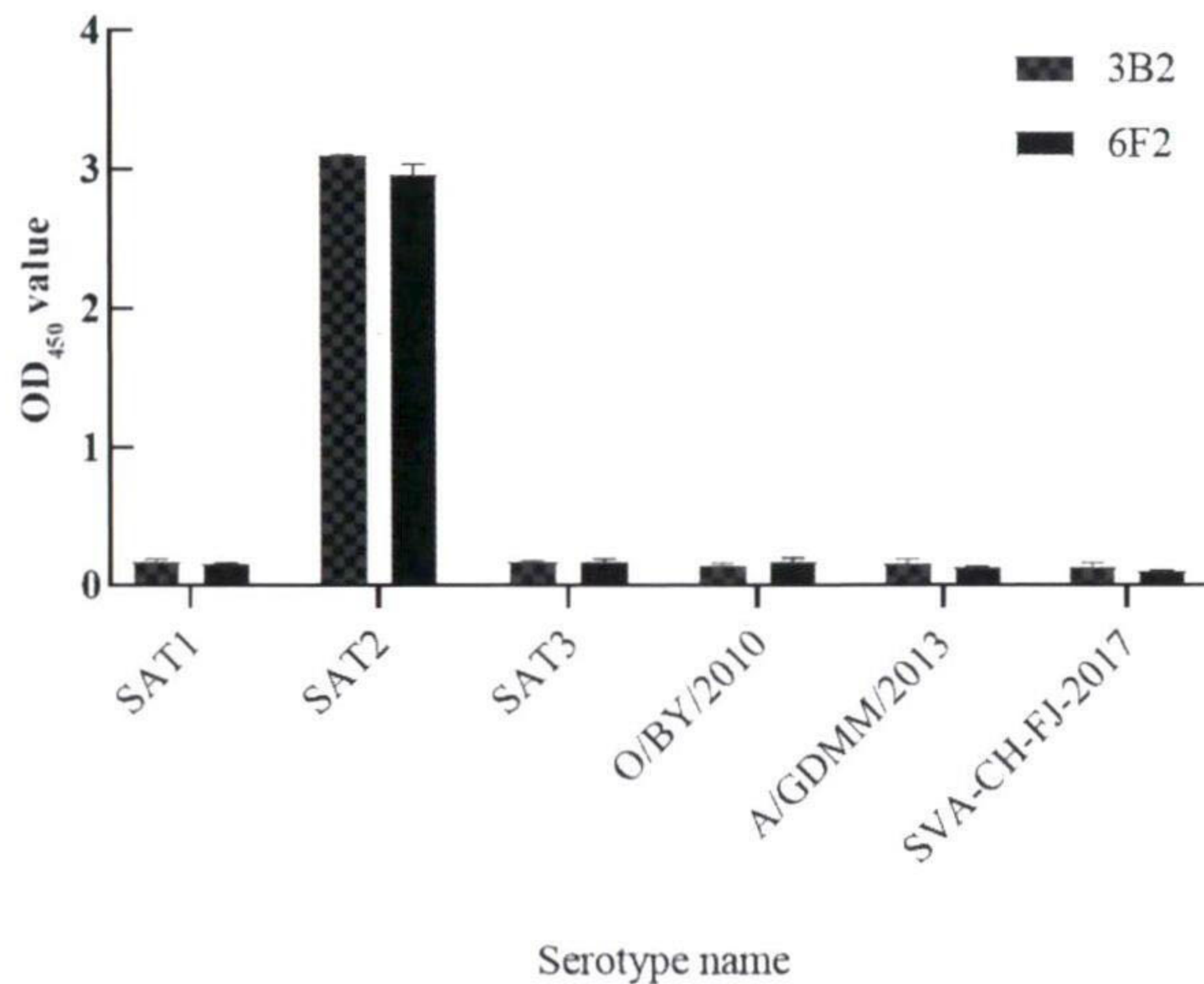


图 7 抗体特异性检测

Figure 7 Antibody specificity test

型中,SAT2 型至少由 14 种拓扑型组成,这种拓扑遗传多样性可能是由于较高的非典型重组引起^[18]。SAT2 型与 FMDV 其他血清型相比,致病力更强。因此,SAT2 型 FMD 拓扑的多样性可能使疫情的控制变得更加困难。当前,SAT2 FMD 在非洲、中东和南亚呈现扩散蔓延趋势,严重威胁到我国家畜养殖产业健康发展。加上这些流行国家的经济普遍落后,FMD 防治技术能力薄弱,而这也恰好为 FMDV 的流行、变异和传播提供了便利。通常情况下,病毒入侵宿主细胞就会刺激机体的免疫系统发挥作用,抑制病毒增殖到最终清除病毒。而 FMDV 为了持续感染宿主,通过不断地变异来逃避免疫系统的防御。VP1 作为主要的结构蛋白之一,含有主要的抗原表位,其遗传变异决定了 FMDV 的进化速率及感染能力^[19]。因此,根据 VP1 的生物学特性和功能,

VP1蛋白常被用于疫苗和诊断制剂的研制及流行病学的调查。目前,除非洲国家外,其他国家均没有SAT2 FMD疫苗,这对疫情的防控有一定的局限性。因此,检疫与诊断就变得尤为重要。

大肠杆菌被广泛应用于表达重组蛋白,具有表达量高、便于操作、周期短和成本低等特点。本研究利用大肠杆菌成功表达了以包涵体形式存在的SAT2-VP1蛋白,使用脲素溶解并通过稀释降低脲素浓度,亲和层析纯化获得目的蛋白。高闪电等^[20]对SAT2-VP1及其C端125个氨基酸区段进行了表达和纯化,同样是以包涵体的形式表达。而包涵体的形成与胞质内蛋白质生成速率有关,且纯化时可以避开蛋白酶对蛋白的损伤,对机械破碎不敏感。用纯化的SAT2-VP1蛋白作为抗原免疫小鼠,通过检测血清得到的高效价已经证实目的蛋白具有较好的免疫性。杂交瘤细胞技术制备MAb已被广泛应用与生物医学的各个领域,并且与多克隆抗体相比,MAb具有特异性高、亲和力强以及可以大量生产等优点^[21],也是诊断病毒感染的关键试剂。而获得高质量的MAb与抗原的质量、免疫程序、细胞融合以及筛选过程等诸多因素有关。本研究利用杂交瘤细胞技术成功筛选出两株能稳定分泌针对SAT2-VP1蛋白的细胞株,采用ELISA检测两株抗体的效价达1:256 000。且两株单抗均具有高反应性和型特异性,不与其他型FMD抗原(SAT1型、SAT3型、O型和A型)发生反应,也不与临床症状最为相似的SVA发生反应,只与SAT2 FMD型抗原反应。通过抗体叠加试验发现,两株单抗具有不同的抗原结合位点,这为SAT2 FMD抗体和抗原(双抗夹心ELISA)检测方法的建立奠定了基础。亚型鉴定结果证明两株单抗有相同的 κ 轻链和不同的亚型重链。

综上所述,本研究利用大肠杆菌表达系统获得SAT2-VP1蛋白,并成功制备了2株针对SAT2 VP1蛋白的MAb,为快速诊断SAT2 FMDV提供生物原材料,为后期诊断方法的建立提供技术支撑,也为边境高风险地区FMD监测提供战略保障。

伦理审查声明

本文所用BALB/c小鼠已获得中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会的审批,获批日期为2023年12月15日,伦理审批编号为LVRIAEC-2023-054。

作者贡献声明

朱昱茜:初稿写作、方案设计、实验操作、软件处理;石正旺、罗俊聪:方案设计、数据管理;陈婕、林永玉、席韬、张帆、

石鑫泰:形势分析、实验操作、有效性验证;包世俊、田宏、郑海学:项目管理、获取资助、监督指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献:

- [1] Dong H, Liu P, Bai M, et al. Structural and molecular basis for foot-and-mouth disease virus neutralization by two potent protective antibodies[J]. Protein Cell, 2022, 13(6):446-453. DOI: 10.1007/s13238-021-00828-9.
- [2] Maree F F, Blignaut B, Aschenbrenner L, et al. Analysis of sat1 type foot-and-mouth disease virus capsid proteins: influence of receptor usage on the properties of virus particles[J]. Virus Res, 2011, 155(2):462-472. DOI: org/10.1016/j.virusres.2010.12.002.
- [3] Kazemi M, Madani R, Aghamaali M R, et al. Preparation and characterization of nanoliposome containing isolated VP1protein of foot and mouth disease virus as a model of vaccine[J]. Arch Razi Inst, 2022, 77(1):37-44. DOI: 10.22092/ari.2021.353322.1596.
- [4] 陈晶, 李昊洲, 张韵, 等. 盐酸胍对口蹄疫病毒完整颗粒和空衣壳的影响[J]. 病毒学报, 2022, 38(02):415-421. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004116.
- [5] Bao H F, Li D, Guo J H, et al. A highly sensitive and specific multiplex RT-PCR to detect foot-and-mouth disease virus in tissue and food samples[J]. Arch Virol, 2008, 153(1):205-209. DOI: 10.1007/s00705-007-1082-y.
- [6] Liu H, Xue Q, Zhu Z, et al. Foot-and-mouth disease virus inhibits RIP2 protein expression to promote viral replication[J]. Virol Sin, 2021, 36(4):608-622. DOI: 10.1007/s12250-020-00322-2.
- [7] Jamal S M, Belsham G J. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of foot-and-mouth disease virus[J]. Infect Genet Evol, 2018, 59:84-98. DOI: org/10.1016/j.meegid.2018.01.020.
- [8] Mouton L, Dekker A, Bleijenberg M, et al. A foot-and-mouth disease SAT2 vaccine protects swine against experimental challenge with a homologous virus strain, irrespective of mild pathogenicity in this species[J]. Vaccine, 2018, 36(15):2020-2024. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.096.
- [9] 赵家昌, 俞挺, 孙建国, 等. 口蹄疫流行现状及防控措施[J]. 山东畜牧兽医, 2023, 44(08):42-45.
- [10] Brito B P, Rodriguez L L, Hammond J M, et al. Review of the global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014[J]. Transbound Emerg

- Dis, 2017, 64(2):316-332. DOI: 10.1111/tbed.12373.
- [11] Gale D P, Pacey A, Bacigalupo D S, et al. Foot and mouth disease in the Middle East and Türkiye[S/OL]. Department for Environment, Food and Rural Affairs, (2023-03-10)[2024-01-12]. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1143515/foot-and-mouth-disease-in-turkey-march-2023.pdf
- [12] Bacigalupo D S, Gale D P, Pacey A, et al. Foot and Mouth Disease in the Middle East and Türkiye[S/OL]. Department for Environment, Food and Rural Affairs, (2023-04-20)[2024-01-12]. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1153832/Foot_and_Mouth_Disease_in_the_Middle_East_and_T%C3%BCrkiye_2023.pdf
- [13] Freath D L, King D D, Pacey A, et al. Foot and mouth disease in the Middle East and North Africa[S/OL]. Department for Environment, Food and Rural Affairs, (2023-02-08)[2024-01-12]. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1135999/Foot_and_Mouth_Disease_in_the_Middle_East_and_North_Africa.pdf
- [14] Ma X, Luo Z, Song R, et al. The foot-and-mouth disease virus Lb protease cleaves intracellular transcription factors STAT1 and STAT2 to antagonize IFN- β -induced signaling[J]. J Immunol, 2023, 210(3):283-296. DOI: 10.4049/jimmunol.2101042.
- [15] Sun M, Gao A X, Ledesma - Amaro R, et al. Hypersecretion of OmlA antigen in Corynebacterium glutamicum through high-throughput based development process[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(8): 2953-2967. DOI: 10.1007/s00253-022-11918-x.
- [16] Kitching R P. Foot-and-mouth disease: current world situation[J]. Vaccine, 1999, 17(13-14): 1772-1774. DOI: 10.1016/s0264-410x(98)00442-3.
- [17] King D P, Ferris N P, Shaw A E, et al. Detection of foot-and-mouth disease virus: comparative diagnostic sensitivity two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays[J]. J Vet Diagn Invest, 2006, 18(1): 93-97. DOI: 10.1177/104063870601800114.
- [18] King A M, Mccahon D, Saunders K, et al. Multiple sites of recombination within the RNA genome of foot-and-mouth disease virus[J]. Virus Res, 1985, 3(4):373-384. DOI: 10.1016/0168-1702(85)90437-x.
- [19] Mahdy S E, Liu S, Su L, et al. Expression of the VP1 protein of FMDV integrated chromosomally with mutant Listeria monocytogenes strain induced both humoral and cellular immune responses [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(4): 1919-1929. DOI: 10.1007/s00253-018-09605-x.
- [20] 高闪电, 常惠芸, 独军政, 等. SAT2型口蹄疫病毒南非地区分离株结构蛋白VP1及其C端的表达、纯化和反应原性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(07): 631-634. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmmi.005728.
- [21] 和燕玲, 陈国华, 王佩雅, 等. 猪 IFN- α 1 重组蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其生物学特性[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(10):1057-1062. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2010.10.018.

Preparation and Characterization of A VP1 - Specific Monoclonal Antibody of South African Type 2 Foot-and-Mouth Disease Virus

ZHU Yuqian^{1,2}, SHI Zhengwang², LUO Juncong², CHEN Jie², LIN Yongyu^{1,2}, XI Tao², ZHANG Fan²,
SHI Xintai², ZHENG Haixue^{1,2*}, BAO Shijun^{1*}, TIAN Hong^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In order to prepare South African type 2 foot-and-mouth disease virus (SAT2-FMDV) specific monoclonal antibodies, in this study, the VP1 protein of SAT2-FMDV was expressed by a prokaryotic system. The target protein was purified by affinity chromatography. The purified VP1 protein was emulsified with Freund's adjuvant and immunized to Balb/c mice. Mouse splenocytes with the most stable serum potency in serum were fused with mouse myeloma SP2/0 cells after reinforcement of the immunization. Indirect ELISA was applied to screen for monoclonal antibodies against the VP1 protein of SAT2-FMDV. The characteristics of the screened monoclonal antibodies were analyzed by specificity tests, overlay tests, and identification of antibody subtype. The VP1 protein of SAT2-FMDV was expressed in this study. Two hybridoma cell lines (3B2 and 6F2) were screened that could stably secrete antibodies specifically targeting the VP1 protein of SAT2-FMDV, and their subtypes were IgG2a and IgG1, respectively. A superposition assay showed that the stacking coefficients of the two monoclonal antibodies was $>40\%$, which indicated that the two monoclonal antibodies were directed against different antigenic sites. The potency of the monoclonal antibodies was up to 1:256 000. A specificity assay used to characterize the monoclonal antibodies revealed no cross-reaction with O-type or A-type foot-and-mouth disease viruses or other common viruses that cause diseases in pigs. The monoclonal antibodies prepared in this study had good specificity and reactivity. Our data lay a foundation for the SAT2-FMDV diagnosis and vaccine development.

Keywords: South African type 2 foot-and-mouth disease virus; VP1 protein; Specific monoclonal antibody

Funding: The present work was supported by National Key Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology (No. 2021YFD1800300), title: Molecular epidemiology and transmission mechanisms of foot-and-mouth disease virus; Major Science and Technology special - State Key Laboratory Restructuring Project (No. 22ZD6NA001), title: Basic theoretical research on infection and immunization prevention and control of important epidemic diseases of domestic animals; Gansu Innovation Consortium Project 2022 (No. 22ZD6NA012), title: Diagnosis Development and industrialization of important livestock diseases; The 14th Five-Year Plan Project of Guangdong Province (No. 2023SDZG02), title: New integrated prevention and control technology for major animal diseases; National Pig Technology Innovation Center Pioneer Technology Project (No. NCTIP-XD/C03), title: Disease and Biosecurity Prevention and Control Innovation Team Basic Construction Tasks..

* Corresponding author: ZHENG Haixue, Email: zhenghaixue@caas.cn; BAO Shijun, Email: bsjdy@126.com

引用本文: 朱昱茜, 石正旺, 罗俊聪, 等. 南非 2 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白单抗的制备与特性研究[J]. 病毒学报, 2024, 40(04): 794-801. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004493

ZHU Yuqian, SHI Zhengwang, LUO Juncong, et al. Preparation and Characterization of A VP1-Specific Monoclonal Antibody of South African Type 2 Foot-and-Mouth Disease Virus[J]. Chin J Virol, 2024, 40(04): 794-801. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004493