

分类号 S855.3
U D C 614.4

学校代码 10129
学 号 2011216020

内蒙古农业大学
硕士学位论文

马传染性贫血病毒 Rev 蛋白单克隆抗体的制备及表位鉴定

**Monoclonal Antibody Preparation and Epitope Identification of
EIAV Accessory Protein Rev**

申请人: 郭纪珂

学科门类: 农 学

学科专业: 预防兽医学

研究方向: 动物传染病学

指导教师: 申之义 教授

王晓钧 研究员

论文提交日期: 二〇一四年六月

内蒙古农业大学 研究生学位论文独创声明

本人申明所呈交的学位论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包括为获得我校或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名： 郭纪珂 日 期： 2014.6.9

内蒙古农业大学研究生学位论文授权使用授权书

本人完全了解内蒙古农业大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属内蒙古农业大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署各单位为内蒙古农业大学，且导师为通讯作者，通讯作者单位亦署名为内蒙古农业大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内 容（保密内容除外），采用影印、缩印或其他手段保存论文。

论文作者签名： 郭纪珂

指导教师签名： 申之文

日 期： 2014.6.9

摘 要

马传染性贫血病毒 (EIAV) 是反转录病毒科慢病毒属成员之一, 可引起严重的马属动物传染病-马传染性贫血病 (EIA)。慢病毒可不断变异逃脱宿主免疫监视, 该特性是慢病毒疫苗很难研制成功的重要因素, 而 EIAV 作为首个研制出疫苗并成功应用的病毒, 被认为是研究慢病毒感染免疫机制的重要模型。Rev 蛋白作为 EIAV 的辅助蛋白之一, 主要承担在病毒复制晚期向核外转运未完成剪切的 mRNA 的作用, 以促进病毒的组装。所以, Rev 在 EIAV 细胞内复制中起着重要作用。最新研究显示, 在疾病感染的不同临床阶段 Rev 会产生变异形成不同的亚型, 因此, 对其结构和功能研究将对研制针对慢病毒的疫苗和药物提供重要的基础研究数据。

单抗是用于对蛋白功能进行研究的重要工具。为此, 本研究通过 PCR 获得 Rev 目的基因, 通过双酶切将其克隆到 pET30a 原核表达载体上, 通过原核表达和蛋白纯化, 获得纯度高并具有免疫原性的 Rev 蛋白。用 Rev 蛋白免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合技术获得了一株分泌针对 Rev 抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 2D9。经 Western blot、间接 ELISA 和间接免疫荧光鉴定, 确证获得单抗具有较高的敏感性和特异性。通过肽扫描技术对 2D9 单抗进行了 B 细胞表位鉴定, 针对表位为 71 QHTPSRRDRWIRGQ 84 , 位于 Rev 蛋白的 RNA 结合区域 (RBD)。该单抗不但为研究 Rev 蛋白结构和功能提供了基础工具, 而且为研究 Rev 与 mRNA 结合的作用机制提供了重要基础。

关键词: 马传染性贫血病; Rev 蛋白; 单克隆抗体; 表位鉴定

Monoclonal Antibody Preparation and Epitope Identification of EIAV Accessory Protein Rev

Abstract

Equine infectious anemia virus (EIAV) is one of the lentivirus of the retrovirus family and is the pathogen of equine infectious anemia (EIA), one kind of infectious diseases that damages equine seriously. The lentivirus could continuously evolve and escape from the host's immune surveillance. It is an important factor of impacting directly the research progress of vaccine development. The EIA vaccine was first successfully developed and applied. EIAV is regarded as the important model to research the immune mechanism of the lentivirus infection. Rev, as an accessory protein of EIAV, mainly transports mRNAs which are unfinished-spliced towards the outside of the nucleus in the late phase of virus replication to promote the assembly of the virus. So Rev plays an important role in the replication of EIAV. The latest studies indicate that Rev could form different sub-types through mutation during different clinical phases of infection, therefore the research on the structure and function of Rev would provide important research data for developing the vaccines and drugs about lentivirus.

Monoclonal Antibody was a tool for studying the function of protein. In this study, the target gene of Rev was obtained by PCR, and then connected to the prokaryotic expression vector Pet30a through double enzyme digestion. After the prokaryotic expression and protein purification, the high-pure Rev with the immunogenicity was obtained. The pure Rev protein was used to immunize the 8 weeks old BALB/c mouse and one hybridoma cell strain secreting the antibody against Rev was acquired through cell fusion technique, which was named 2D9. The results of Western Blot, indirect ELISA and IFA indicated that this antibody had relatively high sensitivity and specificity. B-cell epitope of 2D9 was identified through peptide scanning technique which indicated the correspondent epitope was 71QHTPSRRDRWIRGQ84 locating in the RNA binding area (RBD) of Rev. The antibody not only provides a basic tool for researching the protein structure and function of Rev, but also lays an important foundation for researching the interaction mechanism between Rev and mRNA.

Key words: *Equine infectious anemia virus; Rev; antibody; epitope*

Directed by: Prof. SHEN Zhiyi (Ph. D)

Applicant for Master degree: GUO Jike (The Prevention Veterinary Science)

(College of veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

目 录

1 引言	1
1.1 马传染性贫血概述	1
1.2 马传染性贫血病毒概述	1
1.2.1 EIAV 的形态结构和理化性质	2
1.2.2 EIAV 的生物学特性	2
1.2.3 EIAV 的基因组和蛋白	3
1.3 EIAV 感染周期	4
1.4 Rev 蛋白	5
1.4.1 Rev 蛋白的功能域和结构	5
1.4.2 Rev 蛋白的作用	7
1.4.3 Rev 的多样性	9
1.5 单克隆抗体技术	10
1.6 表位鉴定技术	11
1.7 研究目的和意义	12
2 材料与amp;方法	13
2.1 材料	13
2.1.1 病毒株、质粒和菌株	13
2.1.2 主要试剂及实验动物	13
2.1.3 溶液和常用培养基	14
2.1.4 仪器	15
2.2 方法	15
2.2.1 Rev 基因原核表达重组质粒的构建	15
2.2.2 重组质粒的鉴定	16
2.2.3 重组质粒的原核表达	17
2.2.4 蛋白纯化	17
2.2.5 Rev 蛋白单克隆抗体的制备	18
2.2.6 表位鉴定	21
3 结果	23
3.1 Rev 基因	23
3.2 重组质粒 pET-Rev 的鉴定	24
3.3 蛋白 SDS-PAGE 分析	24
3.4 单克隆抗体的制备和鉴定	25
3.4.1 阳性杂交瘤细胞株筛选方法 (ELISA) 的建立	25
3.4.2 融合后杂交瘤细胞的筛选	25
3.4.3 单抗亚型鉴定结果	25
3.4.4 单抗 Western blot 鉴定结果	25
3.4.5 单抗间接免疫荧光 (IFA) 鉴定结果	26
3.4.6 腹水效价的测定	26

3.4.7 腹水的纯化.....	27
3.5 抗原表位鉴定	27
3.5.1 抗原表位的初步鉴定.....	27
3.5.2 抗原表位的精确鉴定.....	27
4 讨论.....	28
4.1 重组质粒的构建和表达	28
4.2 单抗与抗原的反应活性	29
4.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及腹水的制备	29
4.4 表位鉴定	29
4.5 2D9 MAb 的应用前景	30
5 结论.....	30
致 谢.....	31
参 考 文 献.....	32
作 者 简 介.....	38

插图和附表清单

1 图 1.1	EIAV 粒子结构模式图和电镜图.....	2
2 图 1.2	EIAV 前病毒基因组结构及转录产物.....	4
3 图 1.3	EIAV 的感染周期.....	5
4 图 1.4	Rev 蛋白的基因序列和功能域.....	5
5 图 1.5	Rev 蛋白的结构模型.....	7
6 图 1.6	单克隆抗体制备流程图.....	11
7 图 2.1	Rev 基因的分段表达.....	21
8 图 3.1	Rev 基因的扩增结果.....	23
9 图 3.2	重组质粒 pET-Rev 的酶切鉴定结果.....	24
10 图 3.3	重组 Rev 蛋白表达纯化的 SDS-PAGE 分析结果.....	24
11 图 3.4	单抗亚型鉴定结果.....	25
12 图 3.5	单抗 Western blot 分析结果.....	26
13 图 3.6	单克隆抗体的 IFA 鉴定结果.....	26
14 图 3.7	腹水效价的测定结果.....	26
15 图 3.8	单抗纯化的 SDS-PAGE 分析结果.....	27
16 图 3.9	抗原表位的初步鉴定结果.....	27
17 图 3.10	抗原表位的精确定位结果.....	28
18 表 2.1	Rev 蛋白截短表达.....	22
19 表 2.2	N 端和 C 端截短表达.....	23

缩 略 语 表

英文缩写	英文全称	中文名称
EIA	Equine infectious anemia	马传染性贫血
EIAV	Equine infectious anemia virus	马传染性贫血病毒
Bp	Base pair	碱基对
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
HRP	Horseshoe peroxidase	辣根过氧化物酶
TMB	Tetramethyl Benzidine Dihydrochloride	四甲基联苯胺二盐酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	犊牛血清
HAT	Hypoxanthine-aminoperin-thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶
HT	Hypoxanthine-and-thymidine	次黄嘌呤和胸腺嘧啶
MAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
LB	Luria-bertani-medium	LB 培养基
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液

1 引言

1.1 马传染性贫血概述

马传染性贫血 (Equine infectious anemia, EIA) 是马属动物的慢性进行性传染病, 由马传染性贫血病毒 (Equine infectious anemia virus, EIAV) 引起, 以反复发热、消瘦、贫血等为典型症状, 主要经过虻科昆虫的叮咬来传播^[1-2], 隐性感染马因无明显的临床症状, 是更危险的传染源^[3]。本病主要流行于以马属动物作为使役动物的发展中国家, 给这些国家的农业经济带来巨大损失^[4], 是世界上严重危害马属动物的传染病之一。2008 年以来, EIA 新发病例陆续在欧洲、美国和日本出现, 且新发毒株有很高的变异。我国在制定的中长期动物疫病防治规划 (2012-2020) 中将 EIAV 的全国范围内净化列为重要工作目标之一。因此, 无论在世界范围, 或者我国国家层面, 积极开展 EIAV 研究并服务于 EIA 防控, 均具有其现实意义和紧迫性。

马传染性贫血与其他慢病毒引起的疾病不同, 在疾病进程中有其独特之处。感染马在经过几次周期性的慢性感染后, 将转归为隐性感染期, 对体内的 EIAV 形成良好的免疫控制。另外, 还会对致病力强的毒株的感染有一定的抵抗作用^[5]。因此, 研究天然免疫控制 EIAV 感染的机制以及从慢性感染期转归为隐性感染期 EIAV 病毒的变化, 将对研制针对慢病毒的预防疫苗提供有效的提示作用。

70 年代中国科学家沈荣显等人通过在驴白细胞和驴胎皮细胞持续传代, 对 EIAV 强毒株进行致弱, 培育成功了 EIAV 弱毒疫苗, 包括驴白细胞弱毒疫苗 (EIAVDLV) 和驴胎皮细胞弱毒疫苗 (EIAVFDDV)^[6,7], 并在 80 年代在我国广泛用于马传染性贫血病的接种预防, 综合一系列防疫措施成功控制了该病的流行。在大规模应用期间也未发现任何返祖现象和垂直传播现象, 可见该疫苗的有效性和安全性^[8]。该疫苗对中国同源毒株和美国、阿根廷、古巴等地区流行的异源毒株都可以产生有效的免疫保护力^[9]。作为慢病毒中首次研制成功并大范围有效应用的疫苗, 对该疫苗致弱机理的研究将为慢病毒预防疫苗和治疗药物的研制提供有益参考。

1.2 马传染性贫血病毒概述

马传染性贫血病毒是一种感染马属动物的 RNA 病毒, 与人艾滋病病毒 (HIV)、山羊关节炎-脑炎病毒 (CAEV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV) 和绵羊梅迪-维斯纳病毒 (MVV) 等共同组成反转录病毒科慢病毒属^[10], 它们在很多方面都极为相似。EIAV 是第一个被分离出来并确认的具有传染性的反转录病毒^[11]。自 1843 年由法国 Ligné 首次发现以来, 于 1961 年, 日本学者 Kabayash 在体外用马驹骨髓细胞和马外周血白细胞培养获得其病毒粒子, 到 1977 年被证明是 RNA 病毒, 1985 年才将其划分为慢病毒属成员^[12]。马传染性贫血病毒感染马主要侵染巨噬细胞和单核细胞, 并将自己的遗传物质整合到宿主的基因组中, 免疫系统很难将病毒有效的清除, 造成感染马的持续性感染^[13-14]。

1.2.1 EIAV 的形态结构和理化性质

EIAV病毒粒子结构为球形，直径是90-120nm，有厚约9nm的囊膜，囊膜外有小的表面纤突，内包裹一个锥形核心^[15]（如图1.1）。病毒粒子的分子量约为 4.8×10^6 道尔顿（Da），在氯化铯中浮力密度为 1.18g/cm^3 ，沉降系数为110-120S。

EIAV对外界的抵抗力较强，在粪便中能生存两个半月，在低温条件下稳定。但对一些化学试剂敏感，如乙醚、2%~4%氢氧化钠液和福尔马林液，均可在5~10分钟将其杀死。日光照射1~4小时即可死亡。病毒在中性条件下稳定，而对强酸和强碱比较敏感，1h即被灭活。

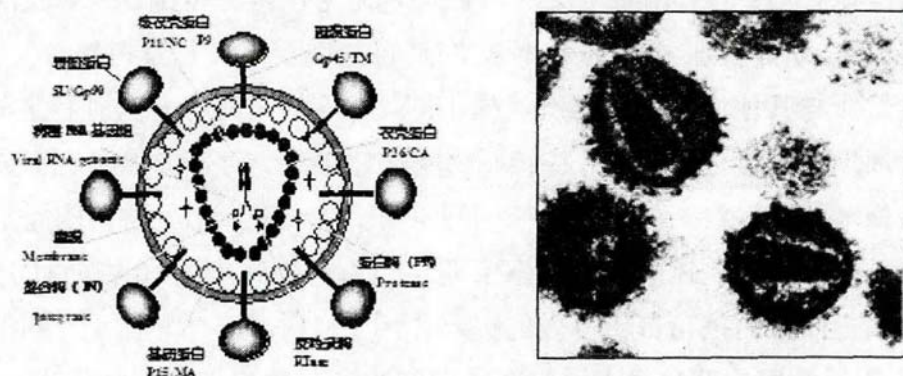


图1.1 EIAV粒子结构模式图和电镜图

Fig1.1 Structure and electron microscope of EIAV particle

1.2.2 EIAV 的生物学特性

病毒在体外具有血凝性，可以凝集豚鼠红细胞，但一些化学试剂或酶类可以改变病毒的感染性和血凝性。如脂溶剂可以破坏其血凝活性和感染性；过碘酸钾和磷酸酯酶能降低感染性而不影响血凝活性；胰蛋白酶能降低血凝活性但不降低感染性；神经氨酸酶能增强血凝活性^[16]。

EIAV主要感染马的单核-巨噬细胞系统，病毒可在肝、脾、淋巴结、肺、肾和甲状腺的巨噬细胞中复制^[17]。在急性感染期和隐性感染期病毒都是在组织巨噬细胞中复制增殖，只是水平有差别^[18]。Sellon等发现外周血单核细胞只能在急性感染期被病毒感染，但不允许病毒发生转录和复制，只有当单核细胞分化成熟并定居在组织中成为巨噬细胞后才能产生病毒^[19]。这样病毒可以通过被感染的单核细胞沉默地进入器官中，这种机制被叫做“特洛伊木马”。EIAV可存在于长期带毒马的内皮细胞中，且EIAV可持续感染内皮细胞培养物，因此内皮细胞可能是EIAV无症状期的储存地^[20]。

在体外许多原代细胞或细胞系都可以培养EIAV病毒，如马巨噬细胞、驴胎皮肤细胞、犬胎胸腺细胞系CfZTh、猫细胞系FEA、犬瘤细胞D17、马内皮细胞等等^[21-22]。

自然条件下, 该病毒主要感染马属动物, 具有典型的疾病进程, 包括急性, 慢性和无症状感染期。目前发现的马传染性贫血病毒主要包括: Wyoming株(美国)、Goshun株(日本)和中国的L毒株(辽宁省)、H毒株(黑龙江省)、Y毒株(新疆)。病毒感染后最先导致严重的伴随着血小板数目减少的高热。急性感染阶段往往需要几天才能消退, 接着动物就进入了一个伴随着贫血、体重减轻和水肿周期性复发的慢性感染阶段。动物在急性和慢性感染阶段容易死亡。经过几次周期性发病后, 感染马即转归为无症状隐性感染期。在此期间, 因感染马体内的病毒载量过低而很难用诊断方法检测到。但隐性感染是相对的, 当感染马免疫力降低时, EIA将复发, 证明感染马的特异性免疫是促使感染马转归为隐性感染期的重要原因。

感染马的病理损伤主要来自宿主对病毒的免疫应答。免疫介导的感染性细胞裂解和免疫复合物介导的炎症反应是实质器官坏死变性的主要原因, 免疫复合物和补体吸附于红细胞可引起贫血和血小板减少, 免疫复合物和补体的沉积作用可刺激巨噬细胞, 使其分泌大量细胞素, 引起病畜发热、沉郁、厌食、超 γ 球蛋白血症以及肾小球肾炎等临床感染症状发生^[23]。

1.2.3 EIAV的基因组和蛋白

在慢病毒属成员中, EIAV的基因组结构最简单, 由通过氢键形成二聚体的两条相同的线状RNA组成, 基因大小8.2bp^[24], 包括两端的非编码区和中间的编码区。病毒RNA通过反转录过程形成的前病毒基因组两端有长末端重复序列LTR(Longterminal repeat), 是非编码区, 包括U3、R、U5三个区, 其排列顺序为5'-U3-R-U5-3'。在U5之后是EIAV反转录引物结合位点PBS(Primer binding site)。EIAV感染宿主细胞后, 在自身编码的反转录酶的作用下合成前病毒DNA, 进一步整合到病畜宿主细胞基因组中。

慢病毒的基因组比较复杂, 除了编码主要结构蛋白外, 为了适应不同的环境条件, 还通过编码一些小的调节因子来调节病毒蛋白的表达水平。EIAV的前病毒DNA通过转录的5条mRNA来编码病毒增殖所需的蛋白^[25](如图1.2), 其编码的蛋白主要有三个结构蛋白: Gag、Pol和Env和三个调节蛋白: Tat、S2和Rev。在病毒感染后最早产生的是包含四个外显子同时编码Tat和Rev蛋白的全剪切mRNA^[26], Tat蛋白从位于5'端主要剪切受体CUG开始翻译, 而编码Rev蛋白的外显子3和外显子4则是在忽略Tat的CUG下翻译的。Rev蛋白出现后, 其它四条mRNA才通过Rev蛋白的剪切作用出现在细胞核内, 继而翻译出病毒的其它蛋白。

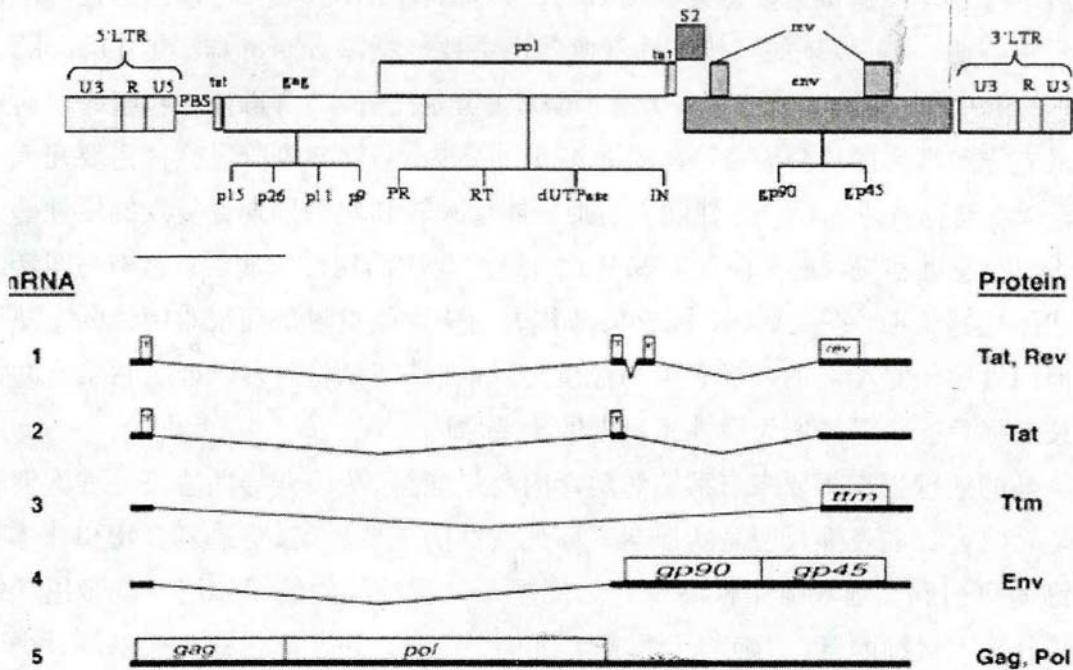


图 1.2 EIAV 前病毒基因组结构及转录产物

Fig1.2 Proviral genome of EIAV and its transcriptions

Gag、Pol 和 env 作为 EIAV 的结构蛋白，是病毒的主要组成蛋白。Gag 蛋白是衣壳蛋白，主要组成病毒的骨架结构，Pol 蛋白可剪切成病毒复制过程中所需的各种酶类，env 蛋白是囊膜蛋白，可与宿主细胞的表面受体作用，使病毒粘附到其表面。

Tat、S2 和 Rev 作为 EIAV 病毒的辅助蛋白，在病毒复制过程中是不可缺少的。Tat 蛋白可以增强病毒 mRNA 的转录，主要在转录期发挥作用^[28]。S2 蛋白在病毒的致病过程中发挥重要的作用，是病毒在体内复制和致病特性的重要决定因素^[29]，另有研究表明 S2 蛋白也可以在胞浆中帮助 Gag 蛋白的聚集^[30]。Rev 蛋白作用主要是从核内向核外转运为完全剪切的 mRNA，以合成病毒复制所需的各种蛋白。

1.3 EIAV 感染周期

EIAV 在感染宿主后，首先通过表面糖蛋白与宿主细胞表面受体结合，粘附到细胞表面。通过与细胞膜融合将病毒 RNA 释放到细胞内部，进入细胞的 RNA 反转录成前病毒 DNA，并将其整合到宿主细胞的基因组中复制和转录，转录的 mRNA 在通过病毒的辅助蛋白从核内转运到核外进行翻译，以合成组装病毒所需的各种结构蛋白，最后经过组装和成熟后通过出芽方式释放到细胞外（如图 1.3）。

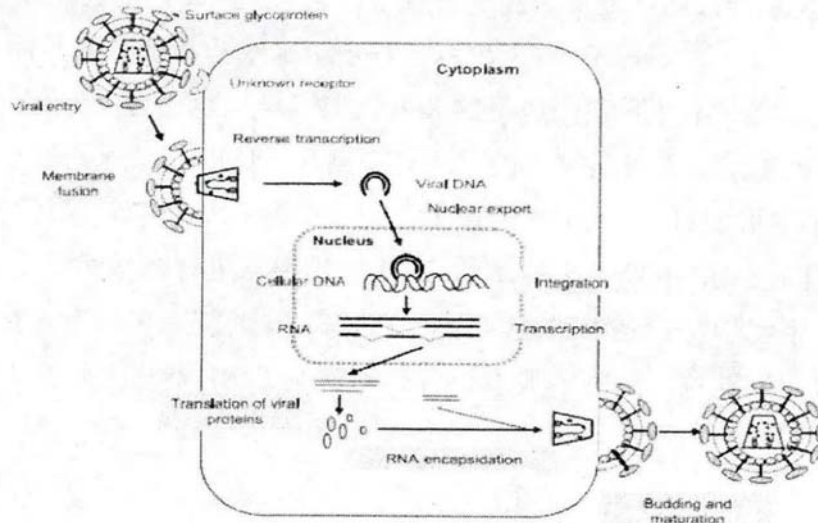


图 1.3 EIAV 的感染周期

Fig1.3 EIAV viral cycle

1.4 Rev 蛋白

1.4.1 Rev 蛋白的功能域和结构

Rev 蛋白是逆转录病毒的一个表达调控蛋白，由含有 4 个外显子的双顺反子 mRNA 编码。体内和体外感染 EIAV 均可检测到 Rev 蛋白^[31 32]。Rev 蛋白是一条长为 165 个氨基酸的蛋白，分子量为 18kDa，主要包括三个结构域：核输出信号区（NES）；RNA 结合区域（RBD）；核定位区域（NLS）^[33]（如图 1.4）。

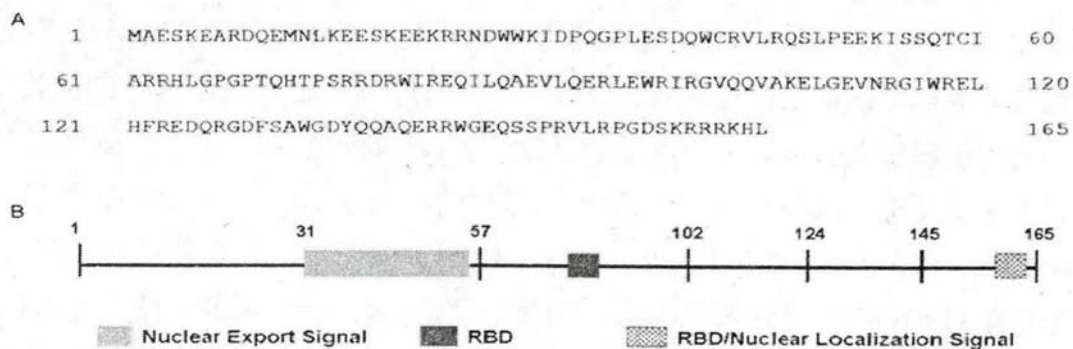


图 1.4 Rev 蛋白的基因序列和功能域

Fig1.4 The sequence and functional domain of Rev

1.4.1.1 核输出信号（NES）

EIAV Rev 蛋白与其他慢病毒属的 Rev 蛋白相比，基因序列有很大的差别，缺少特有的高亮氨酸区域。科学家最早将 EIAV Rev 与 HIV-1 或绵羊髓鞘脱落病毒 Rev 的

RNA-binding 区融合表达, 进行功能域替换实验来确定 NES, 定位在外显子 2 的 N-端区域 (a. a 31-55) [34-35]。EIAV 的 NES 包含许多疏水残基和 3 个对其活性很重要的亮氨酸, 但这些亮氨酸不像其它慢病毒的 Rev 蛋白一样紧紧的连在一起 [36-37]。Otero 等研究发现, 不管是在疏水残基的结构上还是在高百分比的基础氨基酸上, EIAV 的 NES 都与猫免疫缺陷病毒 (FIV) 的 NES 相似 [38]。EIAV 和 FIV 的 NES 很容易被轻肌蛋白 B 抑制, 表明他们与 HIV 的 Rev 一样刺激 Crm1 输出通路进行出核运输 [39]。目前对 EIAV 和 FIV 的 NES 生物学特性还不清楚, 尽管他们与 HIV 的基因序列有差异, 但也可能形成相同的三级空间结构。这种非典型的 NES 可能与 Crm1 不同区域发生作用来刺激输出信号。

1.4.1.2 核定位信号 (NLS)

HIV-1 Rev 核定位信号位于蛋白中间 N 端延伸的高精氨酸区域, 但在 EIAV 中没有相似的区域, 存在于 C 端的 KRRRK 区域可能是其核定位信号区 [40-41, 42]。Harris 等通过对 161 和 162 位的谷氨酸对精氨酸的替换后, 发现 Rev-GFP 融合蛋白失去了核定位功能, 确定该区域为 EIAV 的 NLS。随后, Lee 等在最后的 7 个氨基酸做了更多的缺失和替换, 在轻肌蛋白 B 存在和缺失的情况下对缺失和突变后的 Rev-GFP 融合蛋白进行了亚细胞定位, 发现 C 端仅仅缺失两个氨基酸后该融合蛋白则失去了核定位功能, 对 KRRRK 任何两个临近氨基酸进行丙氨酸替换后也失去了核定位功能, 该结果显示 EIAV 的 NLS 与其他慢病毒的 NLS 一样, 需要一簇基础的氨基酸来发挥功能 [43]。

1.4.1.3 RNA 结合区 (RBD)

因为 EIAV Rev 活性对突变和缺失非常敏感并且基因中没有延伸的高精氨酸区, 所以对其 RNA 结合区的定位比较难。最近 Lee 等通过与缩短了 RRE (Rev 的应答序列) 模板的紫外交联实验直接评价 RNA 结合活性 [44], 发现 Rev 蛋白 C 端 20 个氨基酸对 RNA 结合是非常必要的。Harris 等发现另一个必要的区域在 Rev 蛋白的中心区域, 包括两个结构域: RRDRW (a. a 76-80) ERLE (a. a 93-96), 都对 Rev 蛋白的活性是非常重要的。无论是对 RRDRW 还是对 KRRRK 进行丙氨酸替换, Rev 蛋白的 RNA 结合能力都会降低。这两个较远的区域对 Rev 结合 RNA 是必须的。对 ERLE 区的疏水氨基酸亮氨酸进行天冬氨酸替换后, Rev 蛋白的 RNA 结合能力仅下降 80%, 这表明 ERLE 不是直接作用于 RNA, 而是对稳定 Rev 蛋白结构起重要的作用。

综上所述, EIAV Rev 的 RNA 结合区与 HIV-1 和其它慢病毒不同, 包括两个相距较远的高精氨酸区 [45]。在蛋白的三级结构上, 这两个区域会非常接近, 但他们是形成一个结构域来发挥作用还是各自分别发挥作用目前还无研究数据, 对 EIAV Rev-RRE 结合机理的研究将会使我们更加了解 RNA 结合区。

1.4.1.4 Rev 蛋白的三级结构

Yungok Ihm 等用结构线性方程的方法对 EIAV Rev 蛋白的三维结构模型进行了合成^[46]。因 Rev 第一个外显子对功能无影响^[47]，所以该模型仅由第二个外显子编码的氨基酸构成（如图 1.5），包括六个螺旋，其中四个形成反向平行的螺旋束。NES 包含在第一个螺旋内，3/4 的重要氨基酸分布在蛋白表面。在这个模型中，RRDRW 位于亲水区，并与 KRRRK 并列平行形成一个 RNA 结合表面。ERLE 位于蛋白结构的内部核心区域，参与内部螺旋的形成来稳定蛋白的三级结构。通过这个模型，我们可以更深入的了解 Rev 蛋白的各个功能域是如何配置来发挥其功能活性的。



图 1.5 Rev 蛋白的结构模型

Fig1.5 Structural model of Rev

A The model of the truncated Rev exon2 (a.a. 31-145) The NES domain is colored in orange with four hydrophobic residues critical for export activity shown in space-fill. The RRDRW RNA-binding motif is depicted in red ball-and-stick. The ERLE motif appears in green space-fill. **B**. The model of the full-length Rev exon2 (a.a. 31-165). Basic residues in RRDRW and KRRRK motifs are depicted in red ball-and-stick.

1.4.2 Rev 蛋白的作用

Rev 作为 EIAV 的调控蛋白在其生命周期中发挥着重要的作用，可在病毒复制晚期指导未完全剪接的病毒 mRNA 向核外转运，并加强这些 mRNA 的稳定性，以合成病毒组装所需的各种结构蛋白^[48-49]。Rev 蛋白可以与的细胞内的核转运蛋白共同发挥作用^[50-51]。Rev 蛋白对病毒结构基因的表达和新病毒的产生是非常重要的，他的变异将对病毒的繁殖长产生巨大的影响。

尽管有迹象表明 EIAV Rev 在发挥作用的时候会像 HIV-1 Rev 一样以多聚化形式存在，但目前尚缺乏证据。在亚细胞定位试验中，失去核定位功能的 GFP-Rev 融合蛋

白在补充野生型 Rev 蛋白后, 又会定位到细胞核上。但体外 RNA 结合实验又证明 RRE 与 Rev 可形成复合物。多聚化复合物是 Rev-Rev 互作还是 Rev 在 RRE 基础上多聚化还有待进一步研究。

EIAV 的 RRE 是具有复杂结构的病毒 RNA。尽管大多数慢病毒的 RRE 都在 env 基因的 SU/TM 连接处形成一个延伸的封闭环形^[52,53], 但他们在基因序列上还是有差别的。EIAV 的 RRE 在位置和功能上与 HIV-1 和其它慢病毒有明显的不同, 对 EIAV 的 RRE 进行二级结构预测显示其形成一个单股环。Martarano 等首次对 EIAV 的 RRE 进行了定位^[54], 他研究发现, 当前病毒中删除 env 基因后, 则检测不到 Rev 活性, 然而, 保留 tat/rev mRNA 中的外显子 3 和外显子 4 (RRE-A11 5280-7534) 后, Rev 活性则有部分恢复。Belshan 等通过以 CAT 为基础的 pDM138 质粒报告系统的研究也得到同样的结果^[55], 当采用 tat/rev mRNA 全部外显子 3 和外显子 4 构建报告质粒时, Rev 的活性达到最高。用两个小片段 (RRE-1 和 RRE-2) 对 RRE-A11 进行替换后, Rev 仍具有核输出功能。RRE-1 位于外显子 3 区域, 他保留了 ERRE-A11 的大部分活性, 被认为是 EIAV 的主要 RRE。而 RRE-2 则比 ERRE-A11 的活性低 20%, 被认为是 RRE-1 的增强子。因此大多数研究都对 EIAV RRE-1 进行了明确的定位, 而对 RRE-2 的研究较少。

Rev 缺失的 EIAV 前病毒细胞系只能表达双顺反子 tat/rev mRNA。相反, 当补充 Rev 时, 就能够产生缺少外显子 3 或外显子 3 和 2 都缺少的多剪接和单剪接的 tat/rev mRNA。因此 Rev 除了促进不完全剪接的病毒 RNA 出核之外, 还调节 tat/rev mRNA 的可变剪接。对在外显子 3 区域的 RRE-1 进行基因突变分析发现, 外显子 3 中的特异序列对 Rev 蛋白的核输出和选择性剪接是非常必要的。外显子 3 中包括一个高嘌呤的剪切增强子 (ESE)^[56], 它在前体 RNA 剪切时促进剪切因子与外显子 3 的结合。外显 3 可以结合 EIAV Rev 蛋白和剪切因子 SF2/ASF^[57], 对嘌呤进行嘧啶替换后外显子 3 失去结合这些蛋白的能力。通过这些, 我们建造了一个模型, Rev 选择性剪切是直接或间接抑制 SF2/ASF 或 Rev 与 RRE 的相互作用的结果。Belshan 等对该假设进行验证, 他对 ESE 进行突变后发现外显子 3 的剪切活性降低, 同时 Rev 的核输出和 RNA 结合能力也降低。这些研究证明 Rev 的 RNA 结合和选择性剪切时相互作用的。

尽管有这些数据显示 Rev 与 RRE 区的相互结合可以调节 Rev 选择性剪接, 但对如何抑制的观点有很多不同。一种观点认为 Rev 蛋白和 SF2/ASF 同时结合到病毒 RNA 上, 抑制作用发生在随后的剪切通路上^[58]。通过基因迁移率发现的 Rev/SR 蛋白复合物和通过免疫共沉淀发现的 Rev-SF2/ASF 作用支持这种观点。如果 Rev 蛋白和 SF2/ASF 共同结合到前切 mRNA 上, EIAV Rev 可能会形成核糖核蛋白复合体通过 mRNA

个位点。当提高 SF2/ASF 的表达量时, Rev 蛋白的核输出活性和病毒的复制能力都会降低。如果 Rev 和 SF2/ASF 处于竞争关系, 病毒的复制能力将部分依靠细胞中剪切因子的浓度。尽管 Rev 如何调节剪切能力的机制还不确定, 但这些研究明确提出 RRE 在调节 Rev, 前体 mRNA 和细胞剪切因子之间相互作用中扮演着独一无二的角色。

EIAV 的 RRE 在位置和功能上与其他慢病毒有很大的差别, HIV 的 RRE 的二级结构是一个延伸的颈环结构^[62-63], 而 EIAV 的 RRE 则形成一个单股环结构。通过对已经得到 EIAV 的 RRE1/ESE 的结构模型分析^[64], 结果显示 RRE 的二级结构有许多较大的单股环, 但结构很不稳定。RRE1/ESE 在一个大环的内部。

关于 Rev 蛋白与 RRE 序列相互作用的结构域已经通过 RNA 印迹实验获得详细数据。出乎意料的是, RRE 的两个不同区域在 Rev 存在下发生了结构变化。第一个 Rev 结合区 (RBR-1) 长约 90bp, 包括 ESE; 第二个 Rev 结合区 (RBR-2) 长 110bp, 是一个新发现的 Rev 结合区, 大多数包含 Rev 蛋白的核糖核蛋白复合体与 RBR-2 在大单股环处结合。体外亲和力实验显示 RBR-2 的缺失将导致 Rev 亲和力降低 25 倍, 证明 RBR-2 对 EIAV Rev 和 RRE 的亲合作用是非常重要的。但 RBR-2 在 Rev 的核输出和选择性剪切中的作用机理还不清楚。最近发表的文章证明 HIV-1 的 Rev 蛋白的亲合作用和 Rev-RRE 复合物的形成需要离散的靶位点, 尤其包括 IA 茎环结构^[65]。RBR-1 和 RBR-2 在 Rev 结合 EIAV 的 RRE 中起着相同的作用。

Lee 等人研究发现 EIAV 的 RBR-2 与 HIV-1 的 HB 颈环结构形成的二级结构非常相似。在 HIV-1 和 EIAV 基因中发现的 RNA 功能域在 6/10 的慢病毒属中存在, 而且非常接近 RRE, 在不同的慢病毒中, 它对 Rev-RRE 的识别起着重要的作用。最新研究发现 HIV-1 和 HTLV-1 的 Rev 可以刺激包含鼠乳腺肿瘤病毒 RRE 报告质粒的表达, 这表明慢病毒属的调节蛋白识别相同的 RNA 结构^[66]。

1.4.3 Rev 的多样性

慢病毒有很高的突变和重组率, 因此他们通过变异很快适应宿主环境的改变。结构蛋白特别是 env 能通过基因变异来改变抗原表位来影响中和抗体或 T 细胞 CTL 的识别, 促进病毒对宿主免疫机制的逃脱。对 EIAV 的基因序列分析显示, 包含 Rev 外显子 2 和 TM 胞质尾区的 rev/tm 重叠阅读框容易发生遗传变异^[67]。为了避免蛋白的有害突变的几率, 所以该开放阅读要经过纯化选择, 特别是对病毒复制重要的 Rev 蛋白。然而, 基因变异都发生在 Rev 的非功能区, 但 Belshan 等发现这些变异也会导致 Rev 蛋白核输出活性的变化而对 Rev 的选择性剪切活性无影响。

在整个感染期间内, 新 rev/tm 变体会一直产生, 特别是在临床期间频率最高, 并伴随着病毒复制量的升高。Rev 基因的突变有很少的同义突变, 都是有限密码子的异义突变^[68]。而 Rev 外显子 2 突变时, Rev 的作用元件 RRE 并不发生突变^[69]。系统进

化树分析显示 Rev 有不同的各自独立进化并在机体中共存的亚群,通过瞬时转染和嵌合前病毒复制实验显示每个亚群中的代表 Rev 表型也不同。有趣的是,不同亚型随着疾病的感染进程而发生变化。在慢性感染和反复发病时期,具有高活性的 Rev 亚群较多,而在隐性感染期则转换为低活性的 Rev 亚型。因此,Rev 基因变异可以影响 EIAV 的感染进程。

目前对基因变异引起 Rev 活性变化的机制还尚未研究清楚。在高突变的氨基酸里,仅仅只有 55 位的脯氨酸在功能区,其余的都发生在非功能区。但已有的研究显示对 55 位脯氨酸进行丙氨酸替换后并不影响 Rev 的核输出活性。尽管如此,在 Rev 的变异体中,不管是单个突变还是多个突变,氨基酸的置换都会影响 Rev 的活性。这就证明在非功能区的基因突变也可以影响 Rev 的生物学活性。多重的突变途径可以灵活改变 Rev 的生物学活性,因此,仅仅依靠基因序列式无法预测 Rev 蛋白的表型,对 Rev 多样性的生物学意义还不清楚。

对一定数量的马研究后发现 Rev 表型的变化主要通过宿主体内免疫机制的选择,而这种特异性的选择机理还不清楚。Rev 的基因变异可以通过改变 CTL 表位或降低结构基因的表达以促进病毒的免疫逃脱。CTL 抗原表位最先是在 HIV-1Rev 上发现的^[70],它与疾病进程呈逆相关作用。Mealey 等在隐性感染马体内也发现高亲和的 CTL 表位,然而,这些表位区在 Rev 的保守功能区,包括 ERLE 和 NLS,而这些功能区不会发生非常有意义的突变。所以 CTLs 将会限制病毒的复制而无明显的疾病进程。Mealey 等体外研究中发现这些保守功能区的一些非基本氨基酸也会发生突变,包括 135D 和 138Q^[71]。因此,Rev 的基因突变也可以促使 Rev 逃脱 CTL 的特异性识别。

Rev 多样性影响免疫逃脱的另一种机制是降低结构基因的表达。Bobbitt 等研究发现 HIV-1Rev 可以通过调节后期基因的表达来改变 CTL 对病毒的杀伤作用^[72]。HIV-1Rev 一个氨基酸的改变可以降低 Gag 基因的表达和 CTL 的杀伤作用。在 HIV-1 的隐性感染者体内,HIV-1 的 Rev 活性降低,Gag 蛋白表达量也降低,并对 CTL 杀伤作用的抵抗也增加。HIV-1 的隐性感染期间的 Rev 都以衰减性存在^[73 74 75]。因此,Rev 的变异可以改变病毒的复制水平并改变疾病的临床症状,对 EIAV Rev 的研究更进一步证明了这些。对感染 EIAV 的马进一步研究将提高我们对 Rev 多样性影响免疫逃脱和免疫耐受的认识。

1.5 单克隆抗体技术

长期以来,抗体的获得都是采用抗原反复免疫到动物体内,然后从血清中分离出来。这样不仅产量低,而且抗体特异性差,纯度低,反应液不灵敏。单克隆抗体技术是 20 世纪后期免疫学应用上的重大突破,在 1975 年由英国科学家 Milstein 和 Kohler 建立。它克服了 B 细胞不能在体外进行无限分裂的难题,通过将免疫后的小鼠脾细胞

(B淋巴细胞)和小鼠骨髓瘤(一种可以在体外进行无限传代的浆细胞瘤)进行融合后获得具有两种亲本细胞特征的杂交瘤细胞(如图1.6)。它不但可以在体外培养无限增殖,而且还可以分泌特异性抗体。因此,对任何抗原,半抗原和其它异体蛋白或糖蛋白,我们都可以通过单克隆抗体技术获得针对他们的特异性抗体,在体外或动物体内生产我们所需要的单抗。目前单克隆抗体技术已在疾病诊断与预防、药物研发与基础蛋白研究等方面发挥非常重要的作用。

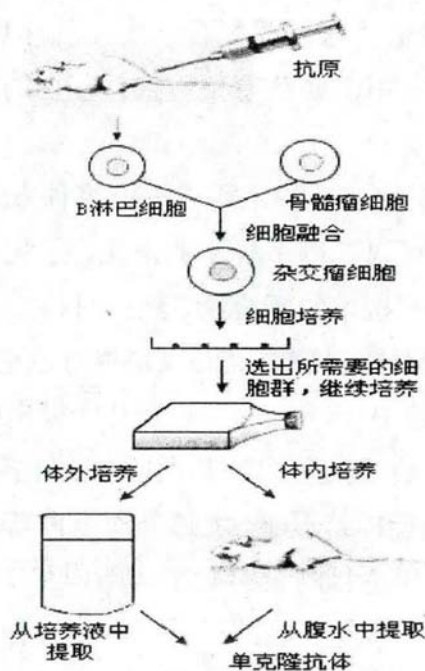


图 1.6 单克隆抗体制备流程图

Fig1.6 The flow chart of monoclonal antibody preparation

1.6 表位鉴定技术

抗原表位是指抗原分子中能与淋巴细胞表面受体结合的化学基团,又称抗原决定簇,作为引起免疫应答的基础,一般由几个氨基酸残基序列或其空间结构组成。根据受体细胞的不同,可分为B细胞表位和T细胞表位,根据结构不同,又分为线性表位和构象表位。线性表位由几个连续氨基酸组成,对天然蛋白和变性蛋白都可以鉴定,构象表位是在三级结构上相互临近的氨基酸组成,仅存在于天然蛋白表面,变性蛋白无法鉴定。目前对抗原表位的鉴定方法主要有以下几种。

(1) 肽扫描技术:是将目的蛋白分段重叠表达,然后通过酶联免疫分析与相应的特异性抗体结合情况,对线性表位进行鉴定^[76]。大多数抗原表位都是三级结构上临近氨基酸组成的构象表位,肽扫描技术只能对线性表位进行鉴定,无法鉴定构象表位。

(2) 定点突变技术: 是将目的蛋白氨基酸序列中的某个或几个进行突变, 通过比较天然蛋白和突变后的蛋白与特异性抗体结合情况的差别, 进而对抗原表位进行定位^[77]。尽管氨基酸定点突变可以对线性表位和构象表位都可以鉴定, 但其也有很大的缺点。突变氨基酸可能不在表位区但会影响蛋白的三级结构而破坏构象表位, 造成抗原与抗体的结合能力降低; 突变氨基酸在表位区但其突变不会影响抗原与抗体的结合能力等等, 这些情况都对表位鉴定的结果造成影响。

(3) 通过 X-ray 衍射或核磁共振技术对抗原抗体复合物进行表位鉴定: 是目前抗原鉴定的金标准, 它可以提供抗原抗体复合物中相互作用的氨基酸残基的晶体结构图^[78]。但是该方法要求较高, 不但要获得抗原抗体复合物的晶体, 而且成本高, 操作复杂。

(4) 质谱技术: 是鉴定表位的一种常用方法, 这种方法可以保持抗原的天然构象。抗原抗体复合物很稳定, 可以抵御多种酶的消化, 因此通过用特殊的酶消化掉未结合的抗原片段, 仅剩下表位和抗体的复合物, 然后对该复合物进行质谱分析获得抗原表位的信息^[79]。该方法对含有酶裂解位点的表位也可以进行鉴定。

(5) 噬菌体展示技术: 是 1985 年 Smith G P 首次提出的, 是快速检测抗原表位的一种廉价的实验方法。通过将目的蛋白的基因插入到噬菌体外壳结构蛋白的适当位置, 在不影响外壳蛋白正常功能的情况下, 通过外源蛋白与外壳蛋白融合表达而将目的蛋白展示在噬菌体表面, 并保持目的蛋白的空间结构和生物活性^[80]。其检测抗原表位的原理是生物淘汰, 基本步骤如下: 将特异性 MAbs 包被在聚乙烯平板上, 加入噬菌体展示肽库敷育, 是其与单抗特异性结合, 然后洗掉未结合的噬菌体, 再用洗脱液将结合的特异性噬菌体洗脱下来, 侵染大肠杆菌扩增后在进行如上筛选, 反复进行 3-4 轮后, 就可以获得与单抗结合紧密的噬菌体克隆。通过对噬菌体携带的外源基因进行测序, 从而鉴定抗原表位。噬菌体作为一种新兴的研究方法和工具, 在蛋白质研究上已经得到广泛地应用。

1.7 研究目的和意义

EIAV 作为首个研制出疫苗并成功应用的慢病毒, 对其疫苗诱导免疫保护机理的研究将对慢病毒其他成员疫苗的研制和治疗药物开发提供有益参考。Rev 作为 EIAV 病毒的一个重要辅助蛋白, 基因全长 495bp, 在 EIAV 的复制增殖过程中起着重要的作用。它主要在病毒复制晚期向核外转运未完成剪切的 mRNA, 促进 mRNA 的表达。已有研究发现, Rev 蛋白在 EIAV 临床感染的不同时期会变异形成不同的亚型, 隐性感染期时 Rev 的活性较低, 而有临床症状出现时 Rev 的活性则变高。这显示 Rev 的变异可以直接影响病毒的复制和致病力。对 Rev 功能的研究, 有助于解析中国弱毒疫苗毒株的弱化机制, 而研制针对 Rev 重要功能域的单克隆抗体可为 Rev 蛋白分子的结构和

功能的研究提供基本的工具。因此，本研究通过构建表达 Rev 蛋白的重组质粒，转染 *E. coli* Rosetta 感受态细胞，IPTG 诱导表达并纯化获得具有良好免疫原性的 Rev 蛋白，然后免疫 8 周龄 BALB/c 小鼠，制备抗 EIAV Rev 的单克隆抗体。为进一步研究 Rev 功能，提供了重要的生物学工具。

Rev 蛋白主要包括三个功能域：核输出信号区（NES）；RNA 结合区域（RBD）；核定位区域（NLS），Rev 通过这三个功能域发挥它在病毒增殖过程中的重要作用。针对某一功能区的研究将为了了解 Rev 蛋白的功能提供基础。为鉴定制备的单抗针对的抗原表位为 Rev 的哪个功能域，将 Rev 分段进行原核表达，进一步进行 Western blot 和 ELISA 检测，最终确定单抗针对的表位为 RNA 结合区域（RBD）。该功能域主要作用是结合未完成剪切的 mRNA，是核输出的前提。但目前对 Rev 蛋白与 mRNA 的结合机理还尚未研究清楚，特别是无法获得 Rev-mRNA 结合后的结构模型，阻碍了研究 Rev 蛋白功能的进程。本研究获得的针对表位为 RNA 结合区域（RBD）的单抗将对研究该功能域的作用机理提供重要的基础。

2. 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 病毒株、质粒和菌株

本研究使用的 EIAV 毒株 EIAV_{tk} 株，表达质粒 pET30a、PMAL-c4x、SP2/0 细胞、293T 细胞等，均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存；用于克隆的感受态细胞为 HB101，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存；用于蛋白表达的感受态细胞为 Rosetta (DE3)，购自大连宝生物公司。

2.1.2 主要试剂及实验动物

DNA 聚合酶购自大连宝生物公司；各种内切酶购自 NEB 公司；胶回收、质粒小提取试剂盒购自 OMEGA 公司；蛋白纯化试剂为 GalaxyBio 公司产品；考马斯亮蓝 H-250 购自 KH 公司；免疫佐剂购自北京康碧泉公司；注射器购自 BD 公司；PEG、HAT、HT 购自 Sigma 公司；HRP 山羊抗鼠标记二抗购自天根公司；IRD 和 FITC 标记荧光二抗购自 Sigma 公司；胰酶、胎牛血清、DMEM 培养液、双抗购自 GIBCO 公司；亚型鉴定试剂盒购自 Southern Biotechnology 公司；TMB 显色液为 Thermo 公司产品；细胞培养瓶、细胞培养板、细胞冻存管购自 Costar 公司；E LISA 板购自 NUNC 公司；HiTrap Protein G HP 购自 GE 公司；BALB/c 小鼠由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

2.1.3 溶液和常用培养基

(1) 50×TAE 缓冲液: 242.0gTris-Base, 37.2g Na₂EDTA·2H₂O, 57.1mL 醋酸, 去离子水定容至 1L。

(2) LB 培养液: 10gNaCl, 10g 胰蛋白胨, 5g 酵母提取物, 去离子水定容至 1L, 调 pH=7.0。

(3) 1M/L IPTG: 2.38gIPTG, 定容至 10mL, 0.22 μm 滤膜过滤。

(4) 10%(w/v) 过硫酸铵 (APS): 1g 过硫酸铵, 去离子水定容至 10mL。

(5) 10%(w/v) SDS: 10gSDS, 去离子水定容至 100mL。

(6) 5×蛋白电泳缓冲液: 15.1gTris-Base, 94g 甘氨酸, 50mL10%SDS, 去离子水定容至 1L。

(7) 转膜缓冲液: 3.0285gTris-Base, 14.41g 甘氨酸, 200mL 甲醇, 去离子水定容至 1L。

(8) 10×TBS 缓冲液: 24.2gTris-Base, 87.6gNaCl, 定容至 1L, 调 Ph=7.4。

(9) PBS 缓冲液: 8gNaCl, 0.2gKCl, 1.42gNa₂HPO₄, 0.27gKH₂PO₄, 去离子水定容至 1L, 调 pH=7.4。

(10) CBS 缓冲液: 1.6gNa₂CO₃, 2.92gNaHCO₃, 去离子水定容至 1L, 调 pH=9.6。

(11) 包涵体蛋白纯化主要试剂: 1×Binding Buffer (1×=8M Urea, 20mM Sodium Phosphate, pH=7.8) ; 1×Wash buffer (1×=8M Urea, 20mM Sodium Phosphate, pH=6.0) ; 1×Wash buffer (1×=8M Urea, 20mM Sodium Phosphate, pH=5.6) ; 1×Elute Buffer (1×8M Urea, 20mM Sodium Phosphate, pH=4.0)。

(12) 透析液:

a. 6M Urea, 0.5mol/L Gly, 5% 甘油, 20mM sodium Phosphate phosphate pH=5.0

b. 4M Urea, 0.5mol/L Gly, 5% 甘油, 20mM sodium Phosphate phosphate pH=6.0

c. 2M Urea, 0.5mol/L Gly, 5% 甘油, 20mM sodium Phosphate phosphate pH=7.0

(13) HAT(HT) 培养液: 20%FBS, 1%双抗, 2%50×HAT(HT) 和 77%DMEM。

(14) 5%脱脂乳: 2.5g 脱脂乳, PBS 定容至 50mL。

(15) 考马斯亮蓝染色液: 0.025g 考马斯亮蓝, 40mL 甲醇, 10mL 冰乙酸, 去离子水定容至 50mL, 滤纸过滤。

(16) 脱色液: 80mL 冰乙酸, 250mL95%乙醇, 去离子水定容至 1L。

2.1.4 仪器

PCR 仪、离心机、pH 计、水浴锅、超声波破碎仪、DNA 连接仪、核酸电泳仪、LAS-3000 成像仪、高速离心机、ELISA 洗板振荡器、酶标仪、荧光显微镜、Odyssey 红外激光成像系统。

2.2 方法

2.2.1 Rev 基因原核表达重组质粒的构建

2.2.1.1 Rev 基因的扩增

以连有 Rev 基因的 T 载体克隆为模板，设计一对特异性引物，上游引物：5'-CCGAATTCATGGCAGAATCGAAGGAAGCAA-3' 酶切位点为 ECOR I；下游引物：5'-ATATGCGGCCGCTAAATGTTTCCTCCTTCGCTTCGAA-3' 酶切位点为 NOT I。引物由华大公司合成，所扩增的目的基因为 495bp。Rev 基因 PCR 反应体系 (50 μ L) 如下：

10uM 上游引物	1 μ L
10uM 下游引物	1 μ L
10 \times LA Taq buffer	5 μ L
LA Taq 酶	1 μ L
2.5mM dNTP	4 μ L
模板 (5ng/ μ L)	1 μ L
水	37 μ L

反应条件如下：

预变性	94 $^{\circ}$ C	5min
变性	94 $^{\circ}$ C	30s
退火	55 $^{\circ}$ C	30s
延伸	72 $^{\circ}$ C	30s
总延伸	72 $^{\circ}$ C	10min

2.2.1.2 PCR 产物的胶回收

PCR 产物经电泳鉴定后，按照 OMEGA 公司的试剂盒的说明书具体步骤进行胶回收。

2.2.1.3 载体与 Rev 基因的双酶切

分别用 ECOR I 和 NOT I 对表达载体 pET30a 与 Rev 基因进行双酶切，双酶切反应体系 (20 μ L) 如下：

10 \times NEB Buffer4	2 μ L
ECOR I	1 μ L

NOT I	1 μ L
-------	-----------

Rev 基因	16 μ L
--------	------------

在 37℃ 水浴锅中 4h, 参照方法“2.2.1.2”胶回收。

PET30a 酶切体系 (20 μ L) 如下:

10 \times NEB Buffer4	2 μ L
-------------------------	-----------

ECOR I	1 μ L
--------	-----------

NOT I	1 μ L
-------	-----------

PET30a	1 μ L
--------	-----------

水	15 μ L
---	------------

同样在 37℃ 水浴锅中 4h, 参照“2.2.1.2”方法做胶回收。

2.2.1.4 连接

连接反应体系 (10 μ L) 如下:

酶切 pET30a	1 μ L
-----------	-----------

酶切 Rev 基因:	7 μ L
------------	-----------

T4DNA 连接酶	1 μ L
-----------	-----------

T4 连接酶 Buffer	1 μ L
---------------	-----------

置于 16℃ 连接仪上过夜。

2.2.1.5 转化

克隆感受态 HB101 置于冰上预先融化, 将连接产物加入其中, 冰浴 30min, 42℃ 热激 90s, 再冰浴 2min。加入 500 μ L 无抗的 LB 后 37℃ 摇床震荡 1h, 10000rpm 离心 1min, 用 150 μ L 培养液重悬沉淀并均匀涂于卡纳霉素抗性的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜。

2.2.2 重组质粒的鉴定

2.2.2.1 菌液 PCR 鉴定

卡纳霉素抗性的 LB 平板上挑取 5 个周边光滑, 大小相等的单一菌落, 置于 5mL LB 的试管中 37℃ 小摇 12h, 做菌液 PCR 鉴定。

2.2.2.2 重组质粒的双酶切鉴定

参照 OMEGA 公司质粒 DNA 提取试剂盒说明书对阳性菌液提取质粒, 做双酶切鉴定。反应体系 (20 μ L) 如下:

pET-Rev	10 μ L
---------	------------

ECOR I	1 μ L
NOT I	1 μ L
10 \times NEB Buffer4	2 μ L
水	6 μ L

在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中作用 4h, 取酶切产物跑琼脂糖凝胶电泳, 分析结果。

2.2.2.3 重组质粒的测序

将鉴定为阳性的重组质粒送博仕测序公司测序。

2.2.3 重组质粒的原核表达

将阳性质粒 pET-Rev 和空载体各 1 μ L 转化 *E. coli* Rosetta (DE3), 方法同 2.2.1.5。挑取卡纳霉素抗性的 LB 平板上的单个菌落, 置于 5mL LB 试管中, 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡 12h, 再按 1: 100 的比例将菌液转接入 200mL LB 中, 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡至 OD_{600nm} 达到 0.4-0.6 时, 按以下方法处理摸索最佳表达条件。

2.2.3.1 温度的确定

按 1:100 的比例在试管中转接三管相同的菌液 5mL, 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡, 当菌液 OD_{600nm} 达到 0.4-0.8 时分别加入 IPTG 至终浓度为 0.2mM, 再分开转移到 16 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 培养 16h, 6h, 和 4h。3000rpm 离心 3min, 弃上清, 沉淀用 1: 10 的 PBS 重悬并超声破碎, 3000rpm 离心 3min 后收集上清和沉淀, SDS-PAGE 分析蛋白表达情况及可溶性, 确定最佳最佳温度。

2.2.3.2 诱导剂浓度的确定

选取温度为 37 $^{\circ}$ C, 按照“2.2.3.1”的方法对诱导剂以 0.2mM、0.4mM、0.6mM、0.8mM、1mM 5 个不同浓度进行表达, 确定最佳诱导剂浓度。

2.2.4 蛋白纯化

按照说明书进行蛋白样品的处理和 Ni-NTA 柱的处理, 所有纯化步骤都在冰上进行, 并靠重力自然沉降。

- (1) 用 0.45 μ m 的滤膜过滤可溶性表达蛋白样品;
- (2) 用 8M Urea 处理样品使蛋白变性;
- (3) 加入蛋白上清样重悬 Ni 粒子, 于摇床上震荡 1h, 静置让其自然沉降。收集部分过柱上清做蛋白纯化效果分析;
- (4) 加 10mL 1 \times Binding Buffer 过柱, 收集过柱液做 SDS-PAGE 分析;

- (5) 加 10mL pH 6.0 的 1×wash Buffer 清洗柱子, 收集过柱液做 SDS-PAGE 分析;
- (6) 加 6mL Ph 5.6 的 1×wash Buffer 清洗柱子, 收集过柱液做 SDS-PAGE 分析;
- (7) 加 5mL Elute Buffer, 用无酶 EP 管分管接收纯化蛋白, 并进行 SDS-PAGE 试验对纯化效果测定, 于-80℃保存;
- (8) 加 10mL ddH₂O 清洗柱子;
- (9) 加 25%酒精, 4℃保存柱子及填料。

2.2.5 Rev 蛋白单克隆抗体的制备

2.2.5.1 动物免疫

共免疫两次, 首次免疫为康碧泉佐剂与免疫原按 1:1 等体积混合, 小鼠后腿肌肉注射; 二免时间为首免 14d 后, 免疫方法同上。七天后对小鼠断尾采血, 用 ELISA 方法测定抗体效价。选取效价较高小鼠进行加强免疫, 腹腔注射纯化的 Rev 蛋白 200μg/只。

2.2.5.2 ELISA 筛选方法的建立

以纯化的 Rev 蛋白为包被抗原, 以二免后采集的血液为一抗, 建立 ELISA 抗体检测方法, 可信结果的判定标准为阳性 OD₄₅₀ 值与阴性 OD₄₅₀ 值比值大于 2.1, 确定最佳包板浓度。

2.2.5.3 杂交瘤细胞的制备

(1) 饲养层细胞的准备

- a. 在融合前 1d 选取健康的 10 周龄 BALB/c 小鼠, 眼球采血并脱颈致死置于 75%酒精中浸泡 5min;
- b. 用无菌的剪刀和镊子钝性打开腹腔, 保持腹膜完整;
- c. 用 5mL 注射器吸取 5mL 1×HAT 培养液注入小鼠腹腔, 接着抽出放入平皿中, 反复 4 次;
- d. 混匀平皿中的细胞, 在 96 孔细胞培养板每孔加入 100μL, 5%CO₂、37℃培养箱中培养。

(2) SP2/O 细胞的准备

选取无污染, 形态正常且状态较好的 SP2/O 细胞作为融合备用细胞。

(3) 脾脏 B 淋巴细胞的制备

- a. 加强免三天后将小鼠采血致死, 在 75%酒精中浸泡 5min 后固定到泡沫板上;
- b. 用无菌的剪刀和镊子钝性打开腹腔, 小心取出脾脏并轻轻剥去脾脏周围的结缔组织, 并用培养液清洗, 不要损伤脾脏;

- c. 用注射器吸取培养液吹脾脏，吹洗液收集到平皿中，直至剩一层薄薄的皮质为止；
- d. 将脾细胞收集到离心管中并进行细胞计数。

(4) 细胞融合

- a. 将小鼠脾细胞与 SP/20 细胞分别移入 50mL 离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清；
- b. 分别加入 10mL 1% 双抗的 DMEM 清洗细胞，1000rpm 离心 5min，弃上清；
- c. 各用 20mL 1% 双抗的 DMEM 重悬细胞，计数后按 SP/20: 脾细胞=1:4 的比例加入另一个 50mL 离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清，尽量避免残留液体；
- d. 在 EP 管架上来回拉动离心管，使细胞混合均匀成糊状；
- e. 取 1mL 在 37℃ 预热的 PEG 于 1min 内缓慢加入并轻轻搅动均匀；
- f. 在 37℃ 水浴锅中作用 90s；
- g. 滴加 1% 双抗的 DMEM 终止 PEG 作用。第 1min 内匀速滴加 1mL，第 2min 内匀速滴加 2mL，第 3min 匀速滴加 3mL，一次总共加入 10mL；
- h. 37℃ 水浴锅作用 5min 后 1000rpm 离心 6min，弃上清；
- i. 用 37℃ 预热的 1×HAT 培养液重悬细胞，按 100μL/孔加入已铺饲养层细胞的 96 孔细胞培养板，置于 37℃, 5%CO₂ 恒温培养箱中。

(5) 融合细胞的换液

融合后第 7 天，用 HT 培养液进行半换液，第 11 天后再用完全培养基全换液。

(6) 阳性细胞株的筛选及克隆化

融合后第 10 天即可进行阳性杂交瘤细胞株的筛选，每孔取 100μL 培养上清采用 2.2.5.2 建立的 ELISA 方法进行阳性鉴定。将鉴定为阳性的杂交瘤细胞在 24 孔板中扩大培养后，取少量细胞计数，稀释到密度为 90-120 个/210mL，按每孔 200μL 加入到 96 孔培养板内，理论上每个孔约含 1 个细胞。37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。并将剩余的阳性杂交瘤细胞扩大培养后冻存。

7-8 天左右观察细胞生长情况，选取只有一个细胞集落孔中的细胞上清 100μL 采用 2.2.5.2 建立的 ELISA 方法进行阳性鉴定，对 OD_{150nm} 值高的细胞在 24 孔板中扩大培养后进行再次亚克隆，剩余的细胞要及时冻存。反复进行，直至阳性率达到 100% 为止。另外，每次 ELISA 都要采用 pET30a 表达产物作为阴性对照。

(7) 杂交瘤细胞的冻存

将稳定分泌抗体且效价高的杂交瘤细胞进行培养，在生长旺盛且状态良好时收集细胞，1000rpm 离心 10min，用细胞冻存液重悬细胞，分装至冻存管后放入冻存盒中，置于 -70℃ 隔夜，最后于液氮罐中长期保存。

2.2.5.4 腹水的制备及纯化

取 12 周龄 BALB/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射 0.5mL 矿物油，7d 后注射 1×10^6 个生长良好的杂交瘤细胞。待 10d 左右观察到小鼠腹腔膨大抽取其腹水，5000rpm 离心 6min，取上清与无菌 EP 管中， -20°C 保存备用。

参照 GE 公司 HiTrap Protein G HP 抗体纯化说明书对腹水进行纯化。

- a. 腹水用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用。
- b. 在每个收集管中预先加入 $60\mu\text{L}$ 1M Tris-HCl, pH=9.0。
- c. 新柱子要先用 10mL 去离子水冲洗。
- d. 用注射器轻轻推动 10mL Binding Buffer (20mM Na_3PO_4 , pH=7.0) 流经柱子，流速大约 1mL/min。
- e. 用注射器轻轻推动过滤后的腹水流经柱子，流速为 0.5mL/min。
- f. 用 10mL Binding Buffer 清洗掉未结合的杂质。
- g. 用 5mL Elution Buffer (0.1M glycine-HCl, pH=2.7) 洗脱抗体。用预先加有 $60\mu\text{L}$ 1M Tris-HCl 的收集管收集，每管收集 $200\mu\text{L}$ 洗脱液。
- h. 洗脱完后，用 20%乙醇清洗并保护柱子， 4°C 保存。

2.2.5.5 单克隆抗体亚型鉴定

参照 Southern Biotechnology 公司的亚类鉴定试剂盒说明书进行。

2.2.5.6 Western blot 鉴定

- a. 转染前 12 小时将 293T 细胞铺至六孔板中；
- b. 细胞长至孔底 40%左右时，即可进行钙法转染；
- c. 预先在两个灭菌的 EP 管中放入 $87\mu\text{L}$ 灭菌水，然后分别加入 $3\mu\text{L}$ 真核表达载体 pcDNA-Rev 和空载体 pcDNA3.1，加入 $10\mu\text{L}$ 2.5mol/L 的 CaCl_2 ，震荡 5s，共 3 次，加入 $100\mu\text{L}$ HPLS，震荡 10s 使其混合均匀；
- d. 将混合好的液体分别加入六孔板中，轻轻晃动六孔板；
- e. 8 小时后将细胞培养上清弃掉，加入新的细胞完全培养液；
- f. 48 小时对细胞进行收集，用细胞裂解液裂解 10min，SDS 变性后备用；
- g. 将样品做 SDS-PAGE 电泳，然后进行半干电转 (15V 1h)；
- f. 在室温下用 TBS 溶解的 5%脱脂乳封闭转膜后的硝酸纤维素膜 2h；
- g. 用 TBS 按 1:2000 比例稀释 MAb 作为一抗，室温作用 2h，TBST 清洗 3 次，每次 10min；
- h. 用 1:10000 比例稀释的 IRD 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗，室温作用 1h，TBST 清洗 3 次，每次 10min；
- i. 在 Odyssey 红外激光成像系统中对其进行扫描分析。

2.2.5.7 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定

- 用 2.2.5.6 中相同的方法对 pcDNA-Rev 和 pcDNA3.1 进行钙法转染;
- 48 小时后, 弃掉细胞培养上清, 用灭菌的 PBS 清洗培养孔 3 次;
- 室温下用 0.1% (v/v) 的 trionx100 对细胞进行固定并打孔 30min, 每孔 1mL;
- 灭菌的 PBS 清洗 3 次, 每次 1min;
- 用 PBS 溶解的 5% 脱脂乳进行封闭 1h, 弃掉上清, 用灭菌的 PBS 清洗 3 次, 每次 1min;
- 向六孔板中加入杂交瘤培养上清, 每孔 1mL, 室温下作用 1h, 弃掉上清, 灭菌的 PBS 清洗 3 次, 每次 1min;
- 加入按 1:2000 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠荧光二抗, 600 μ L/孔。室温下避光作用 45min, 弃掉上清, 灭菌的 PBS 清洗三次, 每次 1min;
- 荧光显微镜下观察各孔的反应情况。

2.2.5.8 单克隆抗体腹水效价的测定

按照建立的 ELISA 方法对收集的腹水效价进行测定, 以阳性 OD450 值/阴性 OD450 值 ≥ 2.1 阳性判断标准。

2.2.6 表位鉴定

2.2.6.1 引物合成

(1). 设计引物扩增重叠区域约 90bp 的两段 Rev 片段, 选取酶切位点 ECOR I 和 NOT I 将上述两段 Rev 克隆到表达载体 pET-30a 上。(如表 2.1, 图 2.1)。

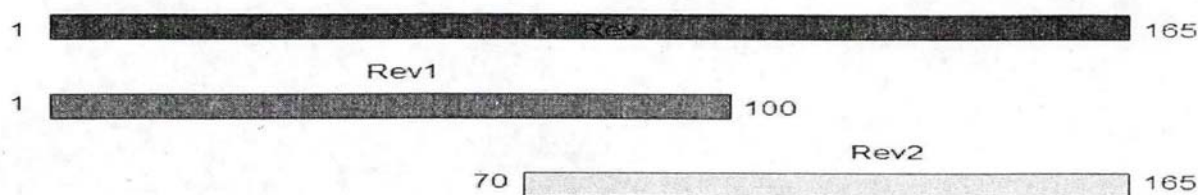


图 2.1 Rev 基因的分段表达

Fig2.1 the divided fragment of Rev gene

(2). 将重叠的 90bp 从两端开始截短, 引物序列直接引入酶切位点 BamH I 和 Sal I 的黏性末端 (如表 2.1), 直接退火后连接到表达载体 PMAL-c4x 上。

表 2.1 Rev 蛋白截短表达

Table 2.1 Lopping expression of Rev protein

肽段名称	引物名称	引物序列	肽段序列	肽段位置
Rev1	Rev1-F	5-CCGAATTCATGGCAGAATCGAAGGAAGCAA-3		1-100
	Rev1-R	5-ATATGCGGCCGCTCTGATTCTCCATTCAGTC-3		
Rev2	Rev2-F	5-CCGAATTCCTAACATACACCTAGCAGGCG-3		70-165
	Rev2-R	5-ATATGCGGCCGCTAAATGTTTCTCTTCCTTCGCTTCGAA-3		
N1	N1-1	5-GATCCcaacatacaccctagcag Gcgtgaccggtggatcaggggaca aatac tacaagcagaagtgTAAG-3	TQHTPSTQHTPSR RDRWIRGQILQAEV	70-90
	N1-2	5-TCGACTTAcaactctctgtgt agtatttgtcccctgatccaccgg tcacgcctgctaggtgtatgttg-3 5-GATCCatcaggggacaaatac		
N2	N2-1	Tacaagcagaagtgtccaggaa cgactggaatggagaatcagaTAAG-3	WIRGQIWIRGQIL QAEVLQERLEWRIR	80-100
	N2-2	5-TCGACTTAatctgattctccat tccagtcgttccctggagcacttct gcttgtagtattgtcccctgatG-3 5-GATCCcaacatacaccctagc		
N3	N3-1	aggcgtgaccggtggat caggggacaaataTAAG-3	TQHTQHTPS RRDRWIRGQI	70-85
	N3-2	5-TCGACTTAatattgtccccc tgatccaccggtcaccg cctgctaggtglatgttgG-3 5-GATCCagcgtgaccgg		
N4	N4-1	tggatcaggggacaaat actacaagcagaagtgTAAG-3	SRRSRRDRW IRGQILQAEV	75-90
	N4-2	5-TCGACTTAcaactctctgt tgtaglatattgtcccctg atccaccggtcaccctG-3		

2.2.6.2 抗原表位的初步鉴定

将 Rev1 与 Rev2 引物以 pET-Rev 为模板 PCR 扩增截短序列, 双酶切后连接到 pET-30a 载体上。其他引物 55℃ 直接退火后连接到双酶切后的 PMAL-c4x 上。将构建成功的重组质粒转化表达感受态 Rosetta。IPTG 终浓度为 0.2mmol/ml, 37℃ 诱导 4h。表达的蛋白通过 ELISA 和 Western blot 检测与抗体的反应性。

2.2.6.3 抗原表位的精确鉴定

对初步鉴定成功的抗原表位分别从 C 端和 N 端逐步截短表达 (如表 2.2), 最终确定表位区。

表 2.2 N 端和 C 端截短表达

Table2.2 Lopping expression from Nterminal and C terminal

截短肽段命名	肽段	氨基酸位置
N3-C1	TQHTPSRRDRWIRGQ	70-84
N3-C2	TQHTPSRRDRWIRG	70-83
N3-C3	TQHTPSRRDRWIR	70-82
N3-C4	TQHTPSRRDRWI	70-81
N3-N1	QHTPSRRDRWIRGQ	71-84
N3-N2	HTPSRRDRWIRGQ	72-84
N3-N3	TPSRRDRWIRGQ	73-84
N3-N4	PSRRDRWIRGQ	74-84

3 结果

3.1 Rev 基因

PCR 产物经核酸电泳, 能观察到 495bp 处清晰的的目的条带 (图 3.1)

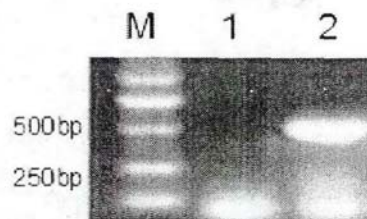


图 3.1 Rev 基因的扩增

Fig3.1 Amplification of Rev gene

M:DL2000 DNA Marker;1:Negative control;2:Rev gene

3.2 重组质粒 pET-Rev 的鉴定

构建的重组质粒，酶切处理后，核酸电泳，可在 5000bp 和 500bp 处观察到清晰地条带（图 3.2），表明质粒构建成功。

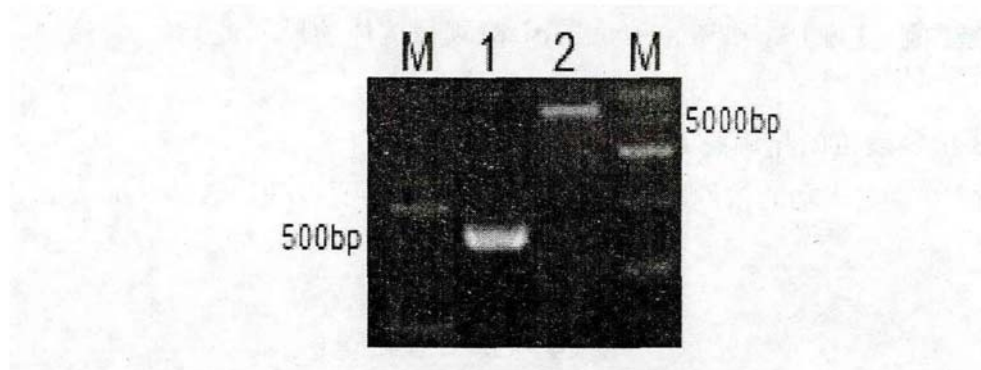


图 3.2 重组质粒 pET-Rev 的酶切鉴定结果

Fig3.2 Identification of the recombinant plasmid pET-Rev by restricted enzyme digestion

M:DL 2000 DNA Marker;1:Rev gene;2:pET-Rev digested with ECOR I and NOT I;M:DL 15000 DNA Marker

3.3 蛋白 SDS-PAGE 分析

将鉴定为阳性的重组质粒 pET-Rev 转化 Rossetta (DE3) 感受态，在最佳条件下(37 °C, 4h) 诱导表达，超声破碎并纯化后，SDS-PAGE 分析可见在 34Ku 处的目的条带（图 3.3）。

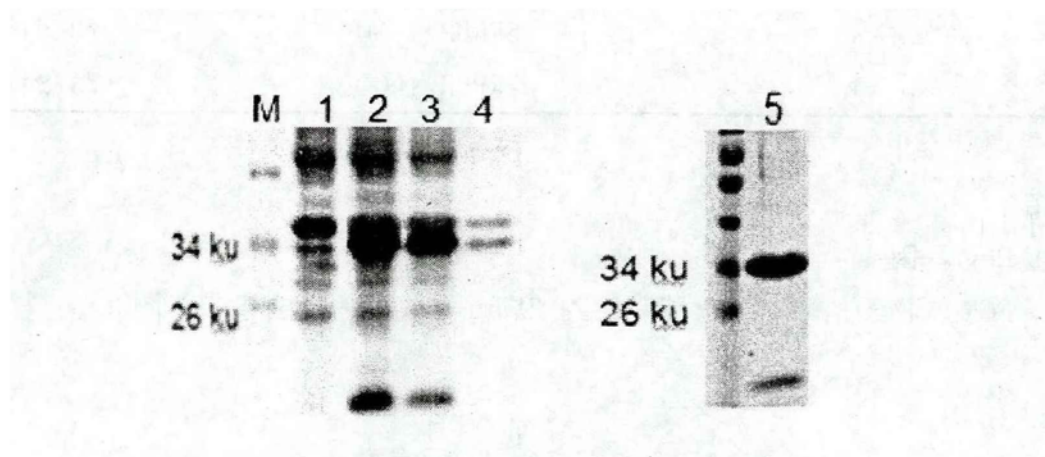


图 3.3 重组 Rev 蛋白表达纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig3.3 Expression and purification of Rev protein were analysed by SDS-PAGE

M:Protein Marker;1:Pet30a/Rosetta induced with IPTG;2: pET-Rev/Rosetta induced with IPTG for 4h;

3:Supermatant of pET-Rev/Rosetta;4:Pellet of pET-Rev/rosetta;5:Purification of the supermatant

3.4 单克隆抗体的制备和鉴定

3.4.1 阳性杂交瘤细胞株筛选方法 (ELISA) 的建立

经条件优化实验, 确定的用于筛选杂交瘤的最佳实验条件为: 包板浓度为 $4\mu\text{g}/\text{mL}$, 一抗为细胞上清, 37°C 作用 1h, 二抗 10000 倍稀释, 37°C 作用 45min, 显色 37°C 2min。

3.4.2 融合后杂交瘤细胞的筛选

用间接 ELISA 方法对融合后 10 天的细胞培养上清进行阳性筛选, 有限稀释法进行 4 次克隆化培养, 获得一株能稳定分泌抗 Rev 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 2D9。

3.4.3 单抗亚型鉴定结果

采用 Southern Biotechnology 公司的亚型鉴定试剂盒, 对 2D9 进行亚型鉴定。结果显示: 该单抗亚型是 IgG2a, 轻链是 κ 链(图 3.4)。

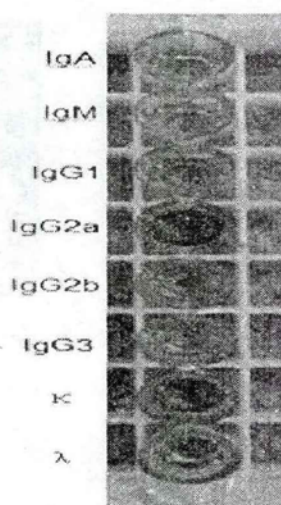


图 3.4 单抗亚型鉴定结果

Fig3.4 Isotype determination of MAb

3.4.4 单抗 Western blot 鉴定结果

WB 实验结果显示, 2D9 可与真核表达的 Rev 蛋白反应, 而与阴性对照无反应(图 3.5)。

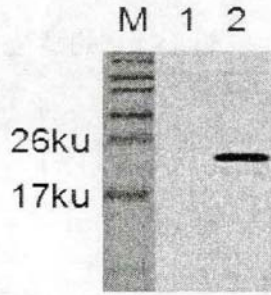


图 3.5 单抗 Western blot 分析结果

Fig3.5 Western blot analysis of monoclonal antibody

M:Protein Marker;1:293T cell transfected pcDNA3.1;2: 293T cell transfected pcDNA-Rev

3.4.5 单抗间接免疫荧光 (IFA) 鉴定结果

将单抗与转染 pCDNA-Rev 和 pcDNA3.1 的 293T 细胞进行 IFA 鉴定,结果如图所示,转染 pCDNA-Rev 的细胞有绿色荧光,而转染 pcDNA3.1 的细胞无绿色荧光(图 3.6)。

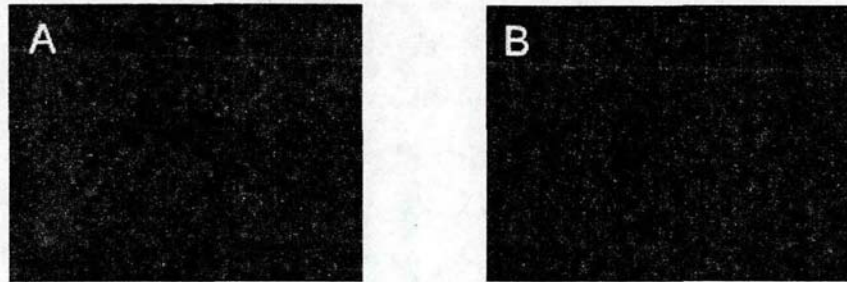


图 3.6 单克隆抗体的 IFA 鉴定结果

Fig3.6 Identification of the MAb by IFA

3.4.6 腹水效价的测定

经 ELISA 鉴定,生产 2D9 的腹水效价约为 $1:10^6$ (图 3.7)。

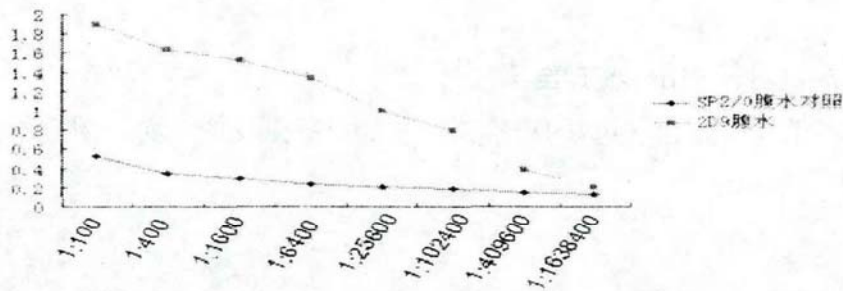


图 3.7 腹水效价的测定结果

Fig.3.7 The determination of ascites titer of 2D9

3.4.7 腹水的纯化

将采集的腹水按照腹水纯化说明书进行纯化后，获得较高纯度的 IgG 抗体。Western blot 结果如图 3.8 所示，可看到 IgG 抗体的两条轻重链。

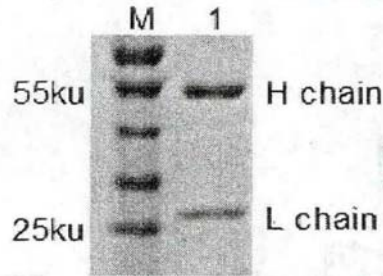


图 3.8 单抗纯化的 SDS-PAGE 分析结果

Fig3.8 Analysis of purified MAb by SDS-PAGE

M:Protein Marker;1:purified ascite

3.5 抗原表位鉴定

3.5.1 抗原表位的初步鉴定

将阳性质粒转化表达感受态 *Rssetta*，经 IPTG 诱导表达后，超声破碎。对获得的蛋白使用 ELISA 和 WB 方法进行初步鉴定。初步鉴定的 2D9 识别的表位位于：70TQHTPSRRDRWIRGQI85。(图 3.9)

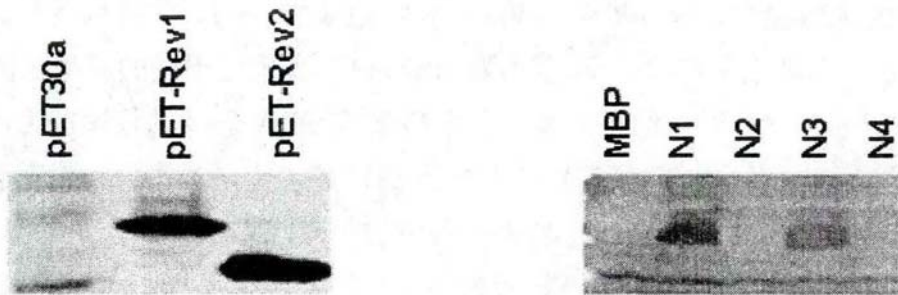


图 3.9 抗原表位的初步鉴定结果

Fig.3.9 The initial identification of epitopes

3.5.2 抗原表位的精确鉴定

将初步鉴定的表位区逐步从 C 端和 N 端逐个截短表达，直至经 ELISA 和 WB 鉴定不发生反应为止。最终鉴定获得的 2D9 识别的最小表位氨基酸序列为：71 QHTPSRRDRWIRGQ 84。(图 3.10)

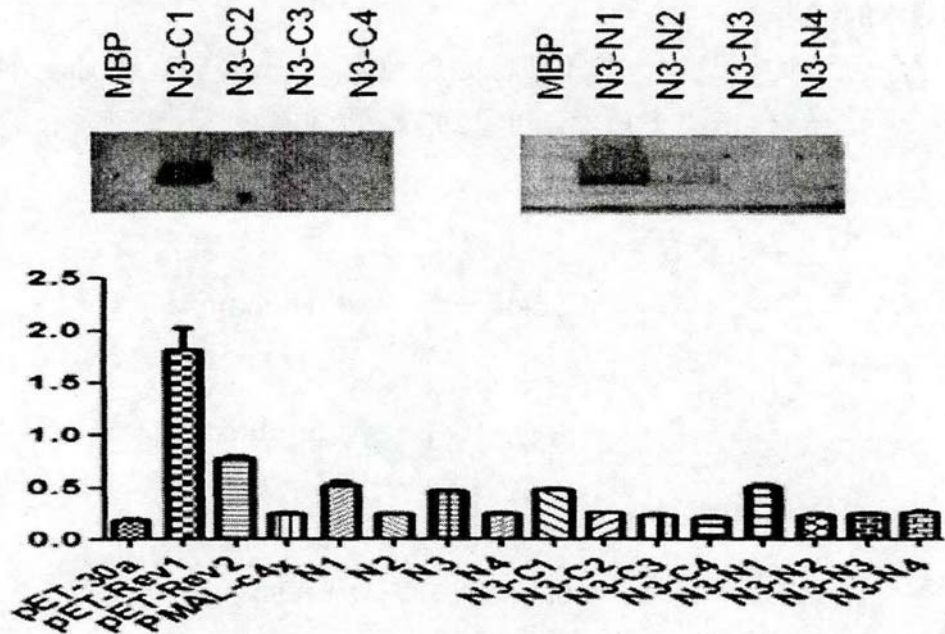


图 3.10 抗原表位的精确定位结果

Fig3.10 Precise locations of antigen epitope

4. 讨论

4.1 重组质粒的构建和表达

Rev 蛋白是 EIAV 病毒的一个辅助蛋白，在 EIAV 增殖过程中起着重要的作用。可在病毒复制晚期指导未完全剪接的病毒 mRNA 向核外转运，并加强这些 mRNA 的稳定性，富集更多的未剪接的病毒 mRNA，以合成病毒组装所需的各种结构蛋白。已有研究发现，在 EIAV 感染临床症状的不同阶段，Rev 也会表现出不同的亚型。因此 Rev 基因在病毒复制过程中有很高的突变率，并直接影响 EIAV 病毒的增殖能力和致病性。对 Rev 功能性研究将会对推动 EIAV 疫苗的致弱机理研究，对慢病毒疫苗和药物研制提供重要的基础。但目前尚未有针对 Rev 蛋白的单克隆抗体，限制了研究 Rev 的进程。本实验通过构建原核表达载体 pET-Rev，通过转染 Rosetta 表达感受态细胞，成功获得了可溶性表达的 Rev 蛋白，为下游单抗的制备奠定了基础。

Rev 蛋白在行使功能时容易形成二聚体，蛋白表达过程中容易折叠成包涵体。高浓度的 IPTG 诱导可以提高蛋白的表达速率以增加蛋白的产量，但也容易因折叠过快形成包涵体。因此，在选取 0.2mM 浓度的 IPTG 下设置了梯度温度 16℃、25℃、37℃ 对蛋白进行诱导表达，结果在不同诱导温度下，Rev 蛋白都是以可溶性表达形式存在的。可溶性蛋白在纯化过程中不需要变性和复性，简化了纯化过程并保持其良好的蛋白构象。选取可溶性 Ni-NTA 柱方法进行纯化后，无法获得 Rev 蛋白，分析可能是因为 Rev 蛋白在形成二聚体时把 pET-30a 载体的 HIS 标签包含在内部，使蛋白在纯化过

程中无法与 Ni 离子结合。对此,对 Rev 蛋白进行了 8M 尿素变形处理,纯化后成功获得了高纯度的 Rev 蛋白。并通过透析实验除去尿素使蛋白复性。本实验间接证明了 Rev 蛋白可能存在二聚体结构。

4.2 单抗与抗原的反应活性

本实验成功获得 1 株针对 EIAV Rev 蛋白的单克隆抗体,命名为 2D9。通过 Western Blot 和 ELISA 实验发现 2D9 MAb 与 Rev 真核表达产物和原核表达产物都发生反应。因为 Rev 蛋白是辅助蛋白,在病毒中表达量少,必须通过浓缩病毒提高病毒粒子浓度才能检测野毒中的 Rev 蛋白。制备单克隆抗体的抗原因浓度的要求,一般都用原核表达产物,但原核表达系统比真核表达系统简单,缺少真核表达系统中一些特殊的修饰作用,另外,蛋白折叠方式的不同也会导致构象差别,从而展示出不同的表位,所以用原核表达蛋白制备出的抗体有很大几率不与真核表达蛋白反应。研究出一种新的免疫方法是获得成功单克隆抗体的必要条件。

4.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及腹水的制备

SP2/0 与脾细胞融合后,因阳性杂交瘤生长速度慢,容易被其它细胞竞争性生长而丢失,因此应及时采用建立的 ELISA 方法进行筛选。另外,为了获得单一的杂交瘤细胞,还要进行克隆纯化,直至阳性率达到 100%时才可进行命名并冻存。本实验在细胞融合后 7 天显微镜下观察细胞长到孔底 30%时进行 ELISA 鉴定,阳性杂交瘤细胞转移至 24 孔板中扩大培养后进行 4 次克隆纯化获得能稳定分泌抗 Rev 蛋白抗体的单一杂交瘤细胞株。

选取制备腹水的小鼠,提前每只注射 500ul 矿物油进行致敏,14 天后再进行杂交瘤细胞注射。一些小鼠在注射杂交瘤细胞后,其腹部隆但腹水量少,剖检大量出血并有实体瘤,分析原因可能是在注射杂交瘤细胞时速度过快,使细胞无法均匀的分布到腹腔,因此,在注射过程中要放慢速度,并轻按小鼠腹部以促进细胞分散。另外,低周龄的小鼠生命力低,在注射杂交瘤细胞后很容易死亡,要选取高周龄的小鼠,特别是经产鼠,制备的腹水量比普通鼠高。小鼠分泌腹水的颜色一开始是淡黄色,接下来慢慢变成红色,此时小鼠也将死亡。红色腹水要离心去除血细胞才可进行腹水纯化。

4.4 表位鉴定

Rev 蛋白主要通过三个功能域来发挥它在 EIAV 增殖过程中的重要作用,包括核输出信号区(NES)、RNA 结合区域(RBD)和核定位区域(NLS)。而本实验制备的 2D9MAb 针对的抗原表位位于 RNA 结合区域(RBD)。该功能域在病毒的产生过程中起着不可或缺的作用。对其突变后,Rev 蛋白丧失核输出和选择性剪切的能力。最新研

究发现 Rev 蛋白的 RNA 结合区包含两个相距较远的高精氨酸 (ARMs)，三级结构预测显示他们非常接近，但对两个 ARMs 是单一的发挥作用还是形成一个结构域来发挥作用还尚未研究清楚。本研究获得的单抗针对的表位正好位于该区域，为该功能区作用机理的研究提供了基础。通过对该功能区的研究将会促使对 Rev 蛋白的功能获得更进一步的了解。

4.5 2D9 MAb 的应用前景

2D9 MAb 可以特异性的识别 Rev 真核表达蛋白，病毒自然感染下的 EIAV UK 毒株也能检测出 Rev 蛋白，可用于 Western blot、ELISA、间接免疫荧光等检测。在后续的研究工作中，该单抗可作为工具通过激光共聚焦实验来检测自然感染下 Rev 蛋白的动态作用过程，实现在自然环境下对 Rev 蛋白发挥功能过程的全程监测；可为通过酵母双杂交筛选与 Rev 蛋白相互作用的宿主蛋白提供检测方法；也可作为稳定工具促进 Rev 蛋白单体晶体结构的获得。为 Rev 蛋白功能的进一步研究提供基础。

5 结论

5.1 利用原核表达系统 *E. coli* Rosetta(DE3) 成功表达可溶性 EIAV Rev 蛋白。

5.2 利用纯化的 Rev 蛋白作为免疫原，免疫 8 周龄小鼠，成功获得一株分泌识别 Rev 蛋白单抗的杂交瘤细胞株，该细胞株具有稳定分泌单克隆抗体的能力，分泌的单抗可应用于 Western blot、ELISA、间接免疫荧光等检测。

5.3 实验证明 MAb2D9 识别的抗原表位为 71 QHTPSRRDRWIRGQ 84，位于 Rev 上的 RNA 结合域 (RBD)。

致 谢

时光荏苒，岁月如梭，三年的研究生生活即将结束，在这期间，我不光在知识水平上有了很大的提高，而且增强了分析并处理问题的能力，这些成长和进步使得我对今后的工作和生活充满了信心，同时也使我意识到毕业后的工作是一个崭新的起点，我会秉持刻苦钻研，不断创新的理念迎接新挑战。此时此刻，非常庆幸研究生生涯中一直帮助和支持我的老师和同学，他们对我的影响将成为我人生中一笔宝贵的精神财富。

首先感谢导师申之义教授给予我极大的关怀和帮助。申之义教授严谨的治学态度，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，儒雅谦和的人格魅力深深地影响了我，三年时间太过短暂，但他对我的激励和鞭策将使我受益终生。

该论文是在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所慢病毒基础免疫实验室完成的。非常感谢王晓钧研究员给予的悉心指导和帮助，他严谨求实和精益求精的工作作风为我树立了榜样，使我终生受益。

感谢本课题组马建副研究员、刘获获老师和胡哲老师在实验设计和操作上给予我的启发和指导。

特别感谢戈曼硕士、赵世华硕士在本实验中的耐心指导，使得我的课题能较快地顺利完成。感谢尹鑫博士、艾有为博士、张泽力硕士、蔡伟刚硕士、吴星亮硕士等同学实验上和生活上的关心和帮助。感谢徐君、王晓贤，张鹏在实验器材准备工作上的积极配合。

参 考 文 献

- 1 Foil L. D., Adams W. V., McManus J. M., Issel C. J., Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens[J]. *J. Med. Entomol.* 24 (1987)613-616.
- 2 Foil L. D., Meek C. L., Adams W. V., Issel C. J., Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*) [J]. *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 155-156.
- 3 刘海芳. 感染马传染性贫血病毒的巨噬细胞差异表达蛋白质组分析[D]. 中国农科院哈尔滨兽医研究所, 2013.
- 4 王晓钧. 中国马传染性贫血病毒强毒株致病性分子克隆的建立及其生物学特性的研究[D]. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2003.
- 5 Montelaro RC., Ball JM., Rushlow KE. Equine retroviruses[J]. *J. A. Levy.* 1993, 257-360
- 6 沈荣显, 徐振东, 何云生, 马传染性贫血免疫的研究[J]. *中国农业科学*, 1979, 4: 1-15.
- 7 沈荣显, 王振漪, 董君平等. 马传染性贫血病驴胎皮肤细胞弱毒疫苗株及其培育方法[P]. 中国发明专利, ZL01123620.5, 2005.
- 8 沈荣显, 马传染性贫血病驴白细胞弱毒疫苗的研制与应用[C]. 国际马传染性贫血病免疫学术讨论会文集, 哈尔滨, 1983, 21-33.
- 9 孔宪刚, 宁希德. 马传贫强、弱毒血清抗体鉴别诊断法在古巴的应用[J]. *中国畜禽传染病*, 1994, 16(1): 35-37.
- 10 于力, 张秀芳主编. 慢病毒和相关疾病. 中国农业科技出版社, 1996.
- 11 Leroux C., CadorÉa J., Montellaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV' s country cousin got to tell us[J]? *Vet. Res.* 2004, 35: 485-512.
- 12 马建, 史楠, 等. 马传染性贫血病毒疫苗株 EIAV-FDDV 穿膜蛋白 GP45 的截短突变[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(3): 377-382.
- 13 Meng Qing-lai, Lin Yue-zhi, Ma Jian, et al. A pilot study on an attenuated Chinese EIAV vaccine inducing broadly neutralizing antibodies[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(8): 1455-1462.
- 14 Wang Xue-feng, Wang Shuai, Zhou Jian-hua, et al. Unique evolution characteristics of the envelope protein of EIAVLN40, a virulent strain of equine infectious anemia virus[J]. *Virus Genes*, 2011, 42: 220-228.
- 15 Weiland F., Matheka HD., Coggins L., et al. Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV) [J]. *Arch Virol.* 1977;55(4):335-340.
- 16 殷震, 六景华主编, 动物病毒学(第二版). 北京科学出版社, 1997.
- 17 Harrold SM., Cook SJ., Cook RF., et al. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and

- asymptomatic infection in experimentally infected equids[J]. *J Virol.* 2000 Apr; 74(7): 3112-3121.
- 18 Oaks JL., McGuire TC., Ulibarri C., et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol*[J]. 1998 Sep; 72(9): 7263-7269.
- 19 Sellon DC., Perry ST., Coggins L., Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes[J]. *J Viro*, 1992; 66: 5906-5913.
- 20 Oaks J., Ulibarri L C., Crawford TB. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus[J]. *J Gen Virol.* 1999; 80. (9): 2393-2397.
- 21 Leroux C., Issel CJ., Montelaro RC. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony[J]. *J Virol.* 1997. 71 (12): 9627-9639.
- 22 Hines R., Maury W. , DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus[J], *J. Virol. Methods* 2001; 95: 47-56.
- 23 于力, 张秀芳. 慢病毒和相关疾病概论. 中国农业科技出版社, 北 1996.
- 24 Kawakami T., Sherman L., Dahlbery J., et al. Nucleotide sequence analysis of equine infectious anemia virus proviral DNA[J]. 1987. *Virology*, 158: 300-331.
- 25 Susan Carpenter, Drena Dobbs. Molecular and Biological Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Rev[J]. *Current HIV Research.* 2010. 2: 87-93.
- 26 Henderson LE, R C Sowder, G W Smythers, et al, Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins[J]. *JV*, 1987, 61: 1116-1119.
- 27 Hope TJ (1999) The ins and outs of HIV Rev[J]. *Arch Biochem Biophys* 365: 186-191.
- 28 Madore SJ., Cullen BR. Genetic analysis of the cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 Tat function[J]. *J Virol.* 1993. 67(7): 3703-3711.
- 29 Li F., Puffer BA., and Montelaro RC. S2 gene of equine infectious anemia virus is dispensable for viral replication in vitro. *J. Virol*[J]. 1998. 72: 8344-8348.
- 30 Yoon S., Kingsman SM., Kingsman AJ., et al. Characterization of the equine infectious anaemia virus S2 protein. *J. Gen. Virol*[J]. 2000. 81, 2189-2194.
- 31 Rosin-Arbesfeld R., Rivlin M., Noiman S. Structural and functional characterization of rev-like transcripts of equine infectious anemia virus[J]. *J Virol.* 1993. 67(9): 5640-5646.
- 32 Stephen D., Embretson JE., Anderson DC., et al. 1990. Sequence analysis and acute pathogenicity of molecular cloned SIVSmm-pbj14[J]. *Nature* 345: 636-639.

- 33 Matthew D, Daugherty, Bella Liu, et al. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev[J]. NIH Public Access, 2010. 17(11):1337-1342
- 34 Fridell RA, Partin KM, Carpenter S, Cullen BR. Identification of the activation domain of equine infectious anemia virus rev[J]. J Virol 1993; 67: 7317-7323.
- 35 Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals[J]. J Virol 1996; 70: 2350-2359.
- 36 Harris ME, Gontarek RR, Derse D, Hope TJ. Differential requirements for alternative splicing and nuclear export functions of equine infectious anemia virus Rev protein[J]. Mol Cell Biol 1998; 18: 3889-3899.
- 37 Mancuso VA, Hope TJ, Zhu L, Derse D, Phillips T, Parslow TG. Posttranscriptional effector domains in the Rev proteins of feline immunodeficiency virus and equine infectious anemia virus[J]. J Virol 1994; 68: 1998-2001.
- 38 Otero GC, Harris ME, Donello JE, Hope TJ. Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element[J]. J Virol 1998; 72: 7593-7597.
- 39 Otero GC, Harris ME, Donello JE, Hope TJ. Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element[J]. J Virol 1998; 72: 7593-7597.
- 40 Gorlich D, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport[J]. Science 1996; 271: 1513-1518.
- 41 Whittaker GR, Helenius A. Nuclear import and export of viruses and virus genomes[J]. Virology 1998; 246: 1-23.
- 42 Stegh AH, Schickling O, Ehret A, et al. DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus[J]. Embo J 1998; 17: 5974-5986.
- 43 Lee JH, Murphy SC, Belshan M, et al. Characterization of functional domains of equine infectious anemia virus Rev suggests a bipartite RNA-binding domain[J]. J Virol 2006; 80: 3844-3852.
- 44 Chung H, Derse D. Binding sites for Rev and ASF/SF2 map to a 55-nucleotide purine-rich exonic element in equine infectious anemia virus RNA[J]. J Biol Chem 2001; 276: 18960-18967.
- 45 Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MM. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA[J]. J Virol 1998; 72: 3684-3690.

- 46 Ihm Y, Sparks WO, Lee JH, et al. Structural model of the Rev regulatory protein from equine infectious anemia virus[J]. *PLoS One* 2009; 4: 4178.
- 47 Mattaj JW, Englmeier L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase[J]. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 265-306.
- 48 Cullen BR. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways[J]. *Virology* 1998; 249: 203-210.
- 49 Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein[J]. *Annu Rev Microbiol* 1998; 52: 491-532.
- 50 Bolinger C, Boris-Lawrie K. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome[J]. *Retrovirology* 2009; 6: 8.
- 51 Groom HC, Anderson EC, Lever AM. Rev: beyond nuclear export[J]. *J Gen Virol* 2009; 90: 1303-1318.
- 52 Tiley LS, Cullen BR (1992) Structural and functional analysis of the visna virus Rev-response element[J]. *J Virol* 66: 3609-3615.
- 53 Zapp ML, Hope TJ, Parslow TG, Green MR. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7734-7738.
- 54 Martarano L, Stephens R, Rice N, Derse D. Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing[J]. *J Virol* 1994; 68: 3102-3111.
- 55 Belshan M, Harris ME, Shoemaker AE, Hope TJ, Carpenter S. Biological characterization of Rev variation in equine infectious anemia virus[J]. *J Virol* 1998; 72: 4421-4426.
- 56 Contarek RR, Derse D. Interactions among SR proteins, an exonic splicing enhancer, and a lentivirus Rev protein regulate alternative splicing[J]. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2325-2331.
- 57 Belshan M, Park GS, Bilodeau P, Stoltzfus CM, Carpenter S. Binding of equine infectious anemia virus rev to an exon splicing enhancer mediates alternative splicing and nuclear export of viral mRNAs[J]. *Mol Cell Biol* 2000; 20(10): 3550-3557.
- 58 Liao HJ, Baker CC, Princler GL, Derse D. cis-Acting and trans-acting modulation of equine infectious anemia virus alternative RNA splicing[J]. *Virology* 2004; 323: 131-140.
- 59 Swanson CM, Puffer BA, Ahmad KM, Doms RW, Malim MH. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly[J]. *EMBO J* 2004; 23: 2632-2640.

- 60 Cochrane AW, McNally MT, Moulard AJ. The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity[J]. *Retrovirology* 2006; 3: 18.
- 61 Jin J, Sturgeon T, Chen C, Watkins SC, Weisz OA, Montelaro RC. Distinct intracellular trafficking of equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus type 1 Gag during viral assembly and budding revealed by bimolecular fluorescence complementation assays[J]. *J Virol* 2007; 81: 11226-11235.
- 62 Battiste JL, Mao H, Rao NS, Tan R, Muhandiram DR, et al. Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex[J]. *Science* 1996; 273: 1547-1551.
- 63 Mann DA, Mikaelian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, et al. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression[J]. *J Mol Biol* 1994; 241: 193-207.
- 64 Lee JH, Culver G, Carpenter S, Dobbs D. Analysis of the EIAV Rev-responsive element (RRE) reveals a conserved RNA motif required for high affinity Rev binding in both HIV-1 and EIAV[J]. *PLoS One* 2008; 3: 2272.
- 65 Daugherty MD, D'Orso I, Frankel AD. A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA[J]. *Mol Cell* 2008; 31: 824-834.
- 66 Mertz JA, Lozano MM, Dudley JP. Rev and Rex proteins of human complex retroviruses function with the MMTV Rem-responsive element[J]. *Retrovirology* 2009; 6: 10.
- 67 Alexandersen S, Carpenter S. Characterization of variable regions in the envelope and S3 open reading frame of equine infectious anemia virus[J]. *J Virol* 1991; 65: 4255-4262.
- 68 Sparks WO, Dorman KS, Liu S, Carpenter S. Naturally arising point mutations in non-essential domains of equine infectious anemia virus Rev alter Rev-dependent nuclear-export activity[J]. *J Gen Virol* 2008; 89: 1043-1048.
- 69 Baccam P, Thompson RJ, Li Y, et al. Subpopulations of equine infectious anemia virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype[J]. *J Virol* 2003; 77: 12122-12131.
- 70 Addo MM, Altfeld M, Rosenberg ES, et al. The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1781-1786.
- 71 Mealey RH, Zhang B, Leib SR, Littke MH, McGuire TC. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus[J]. *Virology* 2003; 313: 537-552.

- 72 Bobbitt KR, Addo MM, Altfeld M, et al. Rev activity determines sensitivity of HIV-1-infected primary T cells to CTL killing[J]. *Immunity* 2003; 18: 289-299.
- 73 Iversen AK, Shpaer EG, Rodrigo AG, et al. Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual [J]. *J Virol* 1995; 69: 5743-5753.
- 74 Hua J, Caffrey JJ, Cullen BR. Functional consequences of natural sequence variation in the activation domain of HIV-1 Rev[J]. *Virology* 1996; 222: 423-429.
- 75 Churchill MJ, Chiavaroli L, Wesselingh SL, Gorry PR. Persistence of attenuated HIV-1 rev alleles in an epidemiologically linked cohort of long-term survivors infected with nef-deleted virus[J]. *Retrovirology* 2007; 4: 43.
- 76 杜承, 恶性疟原虫 Pf332 抗原的免疫分析[D]. 长春; 吉林大学, 2010.
- 77 张婷, 张学光, 翟秋霞, 等. 计算机建模和点突变分析抗人 CD40 单克隆抗体 5C11 识别的抗原表位[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*. 2011, 18, 355-361.
- 78 Davide C, Jarrrod V, Steven J G, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins [J]. *Science*, 2011, 33(6044): 850-856.
- 79 Anna S, Aneta S, Marlena K, et al, Identification of epitope for anti-cystatin C antibody [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2011, 24(4); 687-699.
- 80 Jiang L, Zhou J M, Yin Y, et al, Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2 [J]. *Virus Research*, 2010. 150; 49-52.

作者简介

郭纪珂, 男, 中共党员, 1988年9月生, 汉族, 陕西渭南人。2007年9月至2011年6月就读于内蒙古农业大学动物科学学院, 获得农学学士学位。2011年9月考入内蒙古农业大学兽医学院预防兽医学专业学习, 导师为申之义教授。硕士期间课题为马传染性贫血病毒附属蛋白 Rev 的单克隆抗体制备及表位鉴定。

硕士期间发表文章:

郭纪珂, 戈曼, 张泽力, 马建, 申之义, 王晓钧。抗马传染性贫血病毒 Rev 蛋白单克隆抗体的制备, 中国预防兽医学报, 2014

郭纪珂, 王晓钧。马腺疫, 畜牧兽医科技信息, 2013