

## 针对猪瘟病毒 E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体的表达及抗病毒活性鉴定

陈姝承<sup>1,2</sup>, 孙慧敏<sup>2</sup>, 李素<sup>2</sup>, 刘平黄<sup>2</sup>, 马吉飞<sup>1</sup>, 仇华吉<sup>1,2</sup>

1 天津农学院 动物科学与动物医学学院, 天津 300384

2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150069

陈姝承, 孙慧敏, 李素, 等. 针对猪瘟病毒 E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体的表达及抗病毒活性鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(8): 1235–1243.

Chen SC, Sun HM, Li S, et al. Expression and antiviral activity of a chimeric porcized monoclonal antibody (cHQ06) against E2 protein of classical swine fever virus. Chin J Biotech, 2017, 33(8): 1235–1243.

**摘要:** 猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是严重危害养猪业的一种烈性传染病, 常造成巨大的经济损失, 是世界动物卫生组织要求必须申报的动物疫病之一。猪瘟的病原是猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV), CSFV 的结构蛋白由衣壳蛋白 (C) 和囊膜糖蛋白 (E<sup>ms</sup>、E1、E2) 构成。E2 蛋白是 CSFV 主要的保护性抗原, 可以诱导机体产生中和抗体, 从而抵抗 CSFV 的感染。此前, 本团队制备了一株针对 CSFV E2 蛋白的鼠源单克隆抗体 HQ06。文中将 HQ06 抗体重链和轻链可变区基因与猪源恒定区基因嵌合后克隆至真核表达载体, 利用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞制备一株针对 CSFV E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体 cHQ06。应用 ELISA、Western blotting 试验证实了 cHQ06 与 CSFV E2 蛋白具有良好的反应性; 中和试验结果表明 cHQ06 可以中和 CSFV。综上所述, 本研究应用 CHO 细胞稳定表达了具有良好反应性和中和活性的针对 CSFV E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体 cHQ06, 为研究 CSFV E2 蛋白结构、功能以及开发新型的 CSFV 诊断和治疗制剂奠定基础。

**关键词:** 猪瘟病毒, 单克隆抗体, 基因工程抗体, 嵌合表达, 悬浮培养

**Received:** June 24, 2017; **Accepted:** July 25, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31672537).

**Corresponding authors:** Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

Jifei Ma. Tel: +86-22-23784590; E-mail: hbmjfts@126.com

国家自然科学基金 (No. 31672537) 资助。

# Expression and antiviral activity of a chimeric porcized monoclonal antibody (cHQ06) against E2 protein of classical swine fever virus

Shucheng Chen<sup>1,2</sup>, Huimin Sun<sup>2</sup>, Su Li<sup>2</sup>, Pinghuang Liu<sup>2</sup>, Jifei Ma<sup>1</sup>, and Huaji Qiu<sup>1,2</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

2 Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150069, Heilongjiang, China

**Abstract:** Classical swine fever (CSF), one of OIE-listed diseases, is a highly contagious and economically important disease of pigs. Classical swine fever virus (CSFV) is the causative agent of CSF. The capsid (C) protein and the glycoproteins E<sup>ms</sup>, E1 and E2, are structural components of the virus. E2 is the most immunogenic protein of the CSFV glycoproteins, inducing neutralizing antibodies that provide protection against lethal CSFV challenge. In a previous study, we developed a murine MAb HQ06 against the E2 protein of CSFV. In this study, the variable region genes from HQ06 and constant regions gene of swine antibody are fused and cloned into the eukaryotic expression vectors to establish a cell line which can stably express a chimeric porcized MAb (cHQ06) against E2 in CHO cell. The purified cHQ06 antibody protein was determined to be successfully generated, which exhibited high reactivity between cHQ06 and the E2 protein of CSFV by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting. More importantly, we investigated the neutralizing activity of cHQ06 against CSFV. In conclusion, this study generated cHQ06 for efficient and stable production which can be used against to develop novel diagnostic assays, investigate the structure and function of the E2 protein and generate novel preparations of diagnosis and treatment.

**Keywords:** classical swine fever virus, monoclonal antibody, genetic engineering antibody, chimeric expression, suspension culture

猪瘟疫 (Classical swine fever, CSF) 是严重危害养猪业的一种烈性传染病, 常造成巨大的经济损失, 该病被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必须申报的一类动物疫病<sup>[1]</sup>。CSF 的病原是猪瘟疫病毒 (Classical swine fever virus, CSFV), CSFV 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组长约 12.3 kb, 是黄病毒科瘟疫病毒属的成员<sup>[2]</sup>。该基因组仅编码一个大的开放阅读框, 其编码一个由 3 898 个氨基酸组成的多聚蛋白。该多聚蛋白被宿主细胞编码的信号肽酶和自身编码的蛋白酶 N<sup>pro</sup>、NS2 及 NS3 切割为 4 种结构蛋白 (C 和 E<sup>ms</sup>、E1、E2) 及 8 种非结构蛋白 (N<sup>pro</sup>、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)<sup>[3-4]</sup>。

衣壳蛋白 C 和糖蛋白 E<sup>ms</sup>、E1、E2 是 CSFV 的结构蛋白<sup>[5]</sup>。E2 为 I 型跨膜蛋白, 其氨基端为胞外区, 羧基端为跨膜区, 将 E2 蛋白锚定在囊膜上<sup>[6]</sup>。E2 蛋白在病毒生命周期中有重要作用, 影响病毒吸附<sup>[7]</sup>、组织嗜性<sup>[8]</sup>和病毒毒力<sup>[9]</sup>。此外, E2 是 CSFV 的主要保护性抗原蛋白, 诱导机体产生中和抗体来抵抗病毒的感染<sup>[10]</sup>。E2 蛋白在氨基端有 B、C、D、A 四个抗原结构域, 构成两个独立的抗原区, 按 B/C 和 A/D 的顺序排列 (aa 690–800 和 766–865)<sup>[11-13]</sup>。

E2 蛋白的抗原特性已经被许多单克隆抗体所鉴定<sup>[14-16]</sup>。在本实验室前期的工作中, 我们制备了一株鼠源 E2 蛋白单克隆抗体 HQ06, 它

可以特异性识别 CSFV C 株和石门株 E2 蛋白的线性表位, 该单克隆抗体重链为免疫球蛋白 G (IgG) 1 型、轻链为  $\kappa$  型<sup>[17]</sup>。

为了克服产生单克隆抗体的杂交瘤细胞不稳定且抗性易丢失等问题, 在本研究中, 我们利用单细胞克隆技术获得 HQ06 重链 (HC)、轻链 (LC) 的基因, 将其与猪源抗体恒定区基因相融合, 克隆至真核表达载体, 并在 CHO 细胞上稳定、高效表达针对 CSFV E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体 (cHQ06)。通过检测实验证实 cHQ06 与 CSFV E2 蛋白具有良好的反应活性。而且, 通过中和试验证实其可以抑制 CSFV 的感染。因此, 本研究证明, 针对 CSFV E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体 cHQ06 可以稳定、高效表达, 为研究 CSFV E2 蛋白结构、功能以及开发新型的 CSFV 诊断和治疗制剂奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、病毒和质粒

人胚肾细胞 (HEK293T)、猪肾细胞 (PK-15) 购自美国标准菌种收藏中心; 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 购于中国科学院细胞库。悬浮 HEK293 细胞由哈尔滨动物生物制品国家工程研究中心有限公司提供。CSFV 石门株在 PK-15 细胞中传代并用 Reed-Muench 公式计算病毒滴度<sup>[18]</sup>。慢病毒载体 pFUGW 及辅助质粒 psPAX2、pMD2.G 由 Addgene 提供。表达抗体重链和轻链的真核表达质粒 pcDNA-HC 和 pcDNA-LC 由哈尔滨兽医研究所猪烈性传染病创新团队保存。

### 1.2 主要试剂

Prime STAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶、限制性内切

酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶、DNA 上样缓冲液等购自 TaKaRa 公司; 目的质粒特异性引物由博仕生物公司合成。HiTrap Protein A HP 预装柱 (5 mL) 购于 GE Healthcare 公司; 分子量为 10 kDa 的超滤管购于 Merck 公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪免疫球蛋白 G (IgG) H&L (Abcam 公司); 鼠抗猪 IgG (BD Pharmingen 公司); HRP 标记的山羊抗鼠的 IgG、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)、伊文斯蓝 (Evans blue)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 IgG 均购于 Sigma-Aldrich 公司。

### 1.3 重组质粒的构建

以 pcDNA-HC 和 pcDNA-LC 质粒为模板, 扩增 cHQ06 重链 (HC) 和轻链 (LC) 基因。琼脂糖凝胶电泳鉴定核酸分子量正确后, 将目的条带胶回收并于 37 °C 酶切 4 h, 将其与同样酶切后的 pFUGW 质粒载体于 16 °C 连接 8 h, 制备重组质粒 pFUGW-HC 和 pFUGW-LC。引物序列见表 1。

### 1.4 共表达 cHQ06 抗体重链和轻链的细胞系的构建

将质粒 pFUGW-HC 和 pFUGW-LC 以及辅助质粒 pMD2.G 和 psPAX2 共转染到 HEK293T

表 1 cHQ06-HC 和 cHQ06-LC 特异性引物序列  
Table 1 Specific primer sequences for amplifying cHQ06-HC and cHQ06-LC

Primer	Sequence (5'-3')
VH/VL-F	CGCg gatccGCCACCATGCCGATGGGC TCCCTGCAGCCCCCTGG
VH-R	CGgaattcTTATTTACCCTGAGTCTTGG AGATGGAC
VL-R	CGgaattcCTAAGCCTCACACTCGTTCC TGCTG

细胞中,制备表达抗体 HC 和 LC 的慢病毒。将重组慢病毒按照感染复数 (MOI) 为 10 感染 CHO 细胞。48 h 之后对细胞计数,应用有限稀释法筛选单细胞克隆,收取其上清用双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (DAS-ELISA) 进行检测,通过检测结果筛选出 cHQ06 抗体细胞系。

### 1.5 cHQ06 的表达和纯化

收集 CHO-cHQ06 细胞系培养上清,使用制备型液相层析系统 ÄKTA explorer 对抗体进行纯化。蛋白洗脱后应用非还原性 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测抗体组装,并应用 Western blotting 等方法分析 cHQ06 的组装以及与兔抗猪 IgG 的反应性。

### 1.6 DAS-ELISA

将纯化的鼠抗猪 IgG 经 1:250 稀释,在 4 °C 条件下,以每孔 100  $\mu$ L 包被 ELISA 板 12 h。包被完成后,每孔加入 150  $\mu$ L PBST 清洗 1 次,然后将含有 5% FBS 的 5%脱脂乳加入到 ELISA 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,37 °C 作用 2 h。将纯化的 cHQ06 经 2 倍系列稀释加入到孔板中,于 37 °C 作用 1 h 后,弃掉抗体,用 PBST 洗涤 3 次。将板子中的 PBST 吸干,加入用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG H&L (1:4 000),于 37 °C 继续孵育 1 h。应用 PBST 洗涤 3 次后加入 TMB 底物显色,15 min 后加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,最后应用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度。

### 1.7 应用间接 ELISA 检测 cHQ06 与 CSFV E2 蛋白的反应活性

分别应用 BHK-21 细胞表达的 CSFV 石门株 E2 蛋白、悬浮 HEK293 细胞表达的 C 株 E2 蛋白或纯化的 CSFV 石门株包被 ELISA 板,每孔

包被 4 ng。在 4 °C 放置 12 h,然后用 5%脱脂乳于 37 °C 封闭 2 h。将纯化的 cHQ06 经 2 倍系列稀释加入孔板中,于 37 °C 孵育 1 h。应用 PBST 洗涤 3 次,加入用 HRP 标记的兔抗猪 IgG H&L (1:4 000),于 37 °C 孵育 1 h,TMB 底物显色后应用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度。

### 1.8 应用 Western blotting 检测 cHQ06 与 CSFV E2 蛋白反应活性

将 BHK-21 细胞表达的 CSFV 石门株 E2 蛋白和悬浮的 HEK293 细胞表达的 C 株 E2 蛋白进行 SDS-PAGE,将蛋白转印至硝酸纤维素 (NC) 膜后,用 5%脱脂乳于室温孵育 2 h。应用 PBS 洗涤 1 次后,将 NC 膜放至 HQ06 腹水 (1:1 000) 及纯化的 cHQ06 中,室温孵育 1.5 h。用 PBST 洗涤 5 次,每次 5 min,洗涤完毕后,分别于 HRP 标记的山羊抗鼠 (1:1 000)、兔抗猪 IgG (1:2 500) 中室温孵育 1 h。应用 PBST 洗涤后,使用多功能荧光化学发光成像分析系统进行扫描,保存灰白图。

### 1.9 病毒中和试验

将纯化的 cHQ06 抗体 2 倍系列稀释,做 6 个稀释梯度和 4 个重复,与每孔中 100 TCID<sub>50</sub> 的 CSFV 石门株等体积混合,于 37 °C 温箱中孵育 2 h。应用冷无水乙醇于 -20 °C 冰箱中固定细胞 15 min,然后将 CSFV 阳性血清 1:100 稀释,加入每孔,于 37 °C 孵育 2 h 后,应用 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min。洗涤结束后加入 1:100 稀释的 FITC 标记的 IgG 和 1:1 000 稀释的伊文斯蓝,放入 37 °C 温箱,孵育 1 h。孵育结束应用 PBST 清洗 5 次,再加入 1:1 000 稀释的 DAPI 将细胞核染色,37 °C 放置 10 min,用 PBS 清洗 5 次后,应用荧光显微镜分析抗体中和效价。

### 1.10 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5 软件分析所有的数据。误差线表示图中所有平均值( $\bar{x}$ )的标准偏差(s)。

## 2 结果与分析

### 2.1 cHQ06 重链、轻链重组质粒的构建

以质粒 pcDNA-HC 和 pcDNA-LC 为模板, 分别应用特异性引物分别扩增 cHQ06-HC、LC 目的基因, 如图 1A 所示, 重链大小为 1 500 bp, 轻链大小为 750 bp, 表明目的片段已被成功克隆。重组质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后在 1 500 bp 和 750 bp 处出现特异条带, 测序结果显示, 其与目标序列一致。结果表明, 质粒 pFUGW-HC 和 pFUGW-LC 构建成功 (图 1B)。

### 2.2 过表达 cHQ06 细胞系的筛选

将转导后的细胞接种于 96 孔板中, 应用有限稀释法筛选单克隆细胞, 显微镜下共观察到有 26 株单克隆细胞, 收取其上清, 应用双抗体夹心 ELISA 检测抗体与兔抗猪 IgG 的反

应性。检测结果表明, 6 号、21 号和 25 号细胞克隆的培养上清与兔抗猪的 IgG 反应性较强, 有可能为阳性细胞 (图 2A)。将这 3 株细胞扩大培养, 收取上清进行纯化, 双抗体夹心 ELISA 检测结果显示, 6 号细胞克隆的培养上清与兔抗猪 IgG 反应性最好, 且呈剂量依赖性 (图 2B)。

### 2.3 cHQ06 猪源抗体活性的检测

将纯化后的 6 号细胞克隆的培养上清 (浓度为 1 mg/mL) 进行非还原性的 SDS-PAGE 分析, 结果表明 cHQ06 抗体可成功组装成为 160 kDa 大小的蛋白, 与猪源抗体蛋白的分子量一致 (图 3A)。为了进一步证明 cHQ06 抗体是否是猪源化抗体, 我们应用 8%非还原性 SDS-PAGE 进行 Western blotting 试验, 在 160 kDa 处检测到抗体蛋白, 这表明, cHQ06 可以和抗猪 IgG 抗体反应 (图 3B)。以上结果证明, cHQ06 抗体成功组装, 并且可被兔抗猪 IgG 识别, 已成功获得猪源化的 E2 蛋白单克隆抗体。

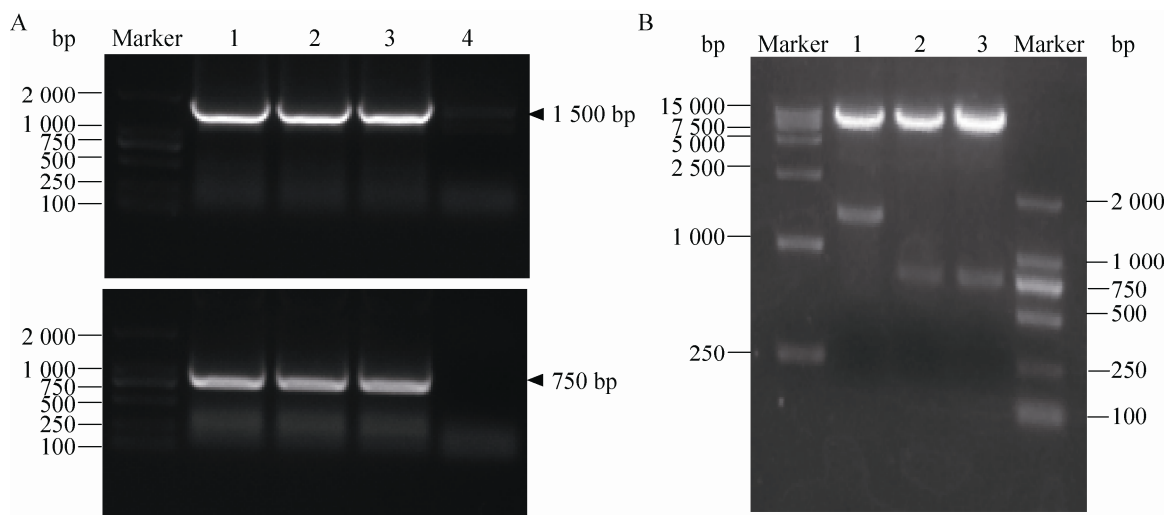


图 1 重组质粒 pFUGW-HC 和 pFUGW-LC 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pFUGW-HC and pFUGW-LC. (A) Amplification results of cHQ06 heavy chain and light chain by RT-PCR; 1–3: the gene of HC and LC; 4: negative control. (B) Identification of plasmids pFUGW-HC and pFUGW-LC; 1: pFUGW-HC; 2: pFUGW-LC; 3: pFUGW.

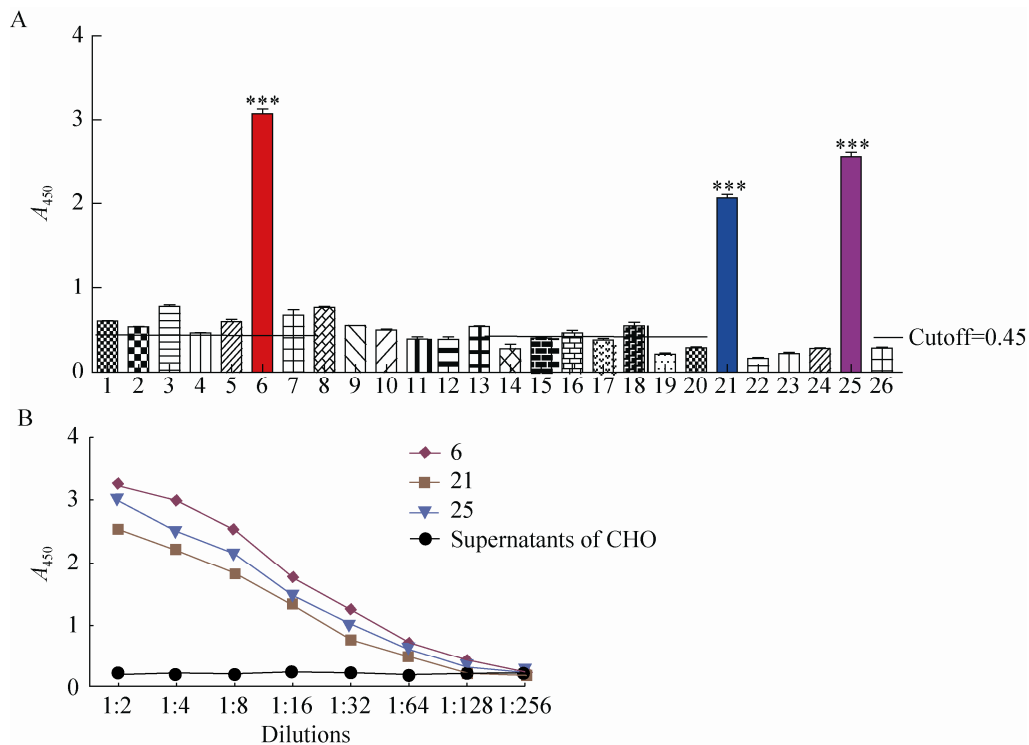


图 2 cHQ06 细胞系的筛选

Fig. 2 Screening of cHQ06 cell line. (A) Screening of positive cell clones of cHQ06 using double-antibody sandwich ELISA. (B) Reactivity of different cell clones of cHQ06 with rabbit anti-pig IgG in a dose-dependent manner.

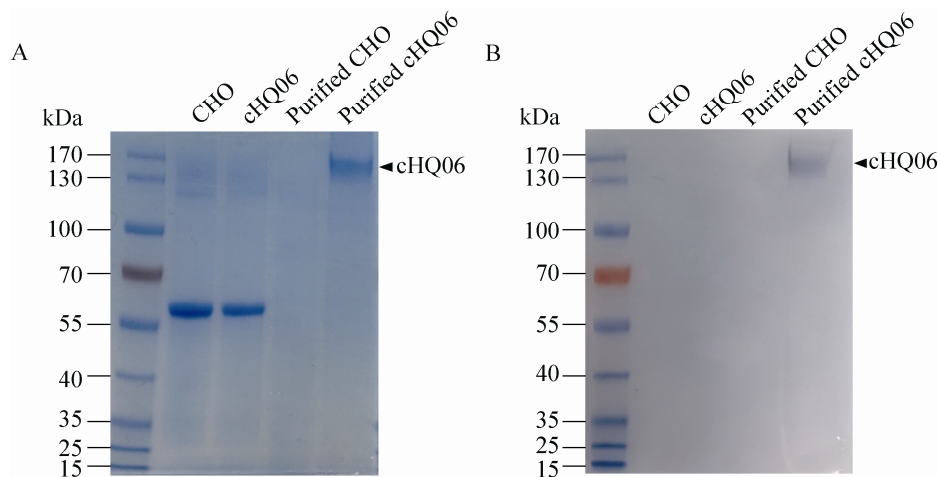


图 3 cHQ06 猪源抗体活性的检测

Fig. 3 Activity measurement of porcized antibody cHQ06. (A) The generation of cHQ06 was examined using SDS-PAGE. (B) The reactivity of cHQ06 and rabbit anti-pig IgG was examined using Western blotting.

## 2.4 cHQ06 反应性的鉴定

应用间接 ELISA 和 Western blotting 验证 cHQ06 抗体和 CSFV E2 蛋白的反应性。间接 ELISA 结果表明, cHQ06 抗体与不同表达系统表达的 E2 蛋白均具有良好的反应性, 并且呈剂量依赖性 (图 4A)。为了进一步证明 cHQ06 抗体的特异性, 应用 Western blotting 试验检测 CSFV C 株和石门株 E2 蛋白与 cHQ06 抗体的反应性, 并用鼠源 HQ06 (浓度为 1 mg/mL) 作为阳性对照。结果表明, cHQ06 抗体识别 CSFV E2 蛋白的能力强于亲本抗体 HQ06 (图 4B), 综上所述,

cHQ06 抗体与 CSFV E2 蛋白有良好的反应性。

## 2.5 cHQ06 抗体对猪瘟病毒的中和作用

HQ06 可以识别 CSFV E2 蛋白表面的  $^{772}$ LFDG $^{778}$  表位<sup>[19]</sup>。为了鉴别 cHQ06 是否具有中和病毒的能力, 将 CSFV 以 100 TCID<sub>50</sub> 与等体积的 2 倍系列稀释 cHQ06 抗体进行孵育, 然后感染 PK-15 细胞, 48 h 后进行间接免疫荧光试验 (IFA)。结果显示, 在 1:2、1:4 和 1:8 的 cHQ06 稀释孔中, 未检测到 CSFV 的特异性荧光灶, 且在 1:16 的 cHQ06 稀释孔中, 只检测到少量荧光灶, 这表明, cHQ06 中和效价为 1:12 (图 5)。

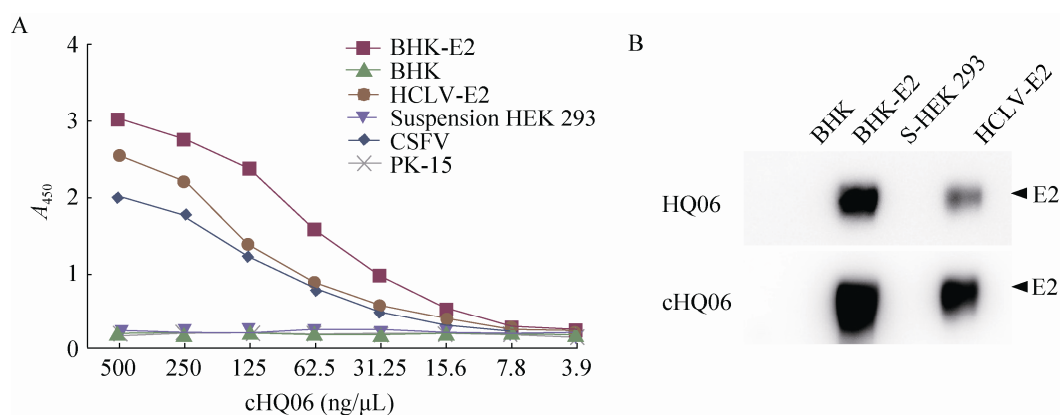


图 4 cHQ06 抗体的反应性检测

Fig. 4 Detection of the reactivity of cHQ06 with the CSFV E2 protein. (A) Indirect ELISA. (B) Western blotting.

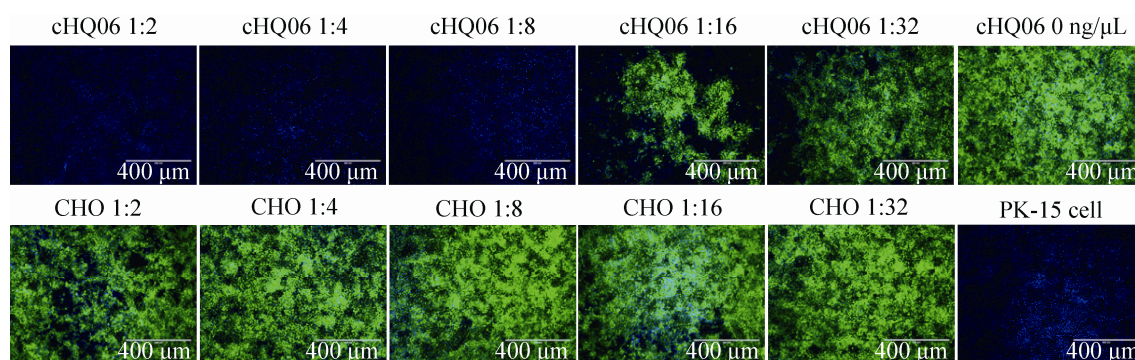


图 5 用中和试验检测 cHQ06 抗体对 CSFV 的中和作用

Fig. 5 Neutralizing activity of cHQ06 against CSFV infection determined by neutralization test. Scale bars represent 400 μm.

### 3 讨论

实验室前期制备了一株针对 CSFV E2 蛋白的鼠源单克隆抗体 HQ06, 并证实该抗体识别 CSFV E2 蛋白<sup>772</sup>LFDGTNP<sup>778</sup>上的一个线性表位<sup>[19]</sup>。由于传统制备单克隆抗体的方法周期过长, 并且因杂交瘤细胞不能长期保存, 有可能造成分泌抗体的细胞活力下降、抗性丢失。在国内外的研究中, 已经有很多制备成功的基因工程嵌合抗体, 将鼠源抗体重链和轻链的可变区嵌合到人源抗体的恒定区的报道有很多<sup>[20-23]</sup>, 但鲜有将鼠源抗体嵌合到猪源抗体中的报道。因此, 在抗 CSFV E2 蛋白抗体的研究中, 考虑到抗体潜在的治疗应用价值, 我们将实验室已有的鼠源抗体嵌合入猪源抗体的恒定区, 使之成为猪源抗体; 并由于 CHO 细胞表达系统产生杂蛋白较少, 能够高效表达 cHQ06 抗体蛋白, 因此成功构建了稳定表达 cHQ06 的 CHO 细胞系, 并通过大量培养细胞、收集和纯化上清以获得抗体蛋白。

在蛋白纯化方面, 我们使用制备型液相层析系统 ÄKTA explorer 纯化抗体蛋白, 现已有很多应用 ÄKTA 纯化蛋白的报道<sup>[24-25]</sup>。传统的蛋白纯化方法费时、费力, 且蛋白容易降解, 洗脱效果不佳。ÄKTA explorer 相比于传统纯化蛋白的方法更高效, 可在短时间内, 在大量流入样品的情况下, 根据紫外峰值快速精准地收取纯化的目的蛋白, 最大程度地避免抗体蛋白的降解。

在中和试验中, 我们应用 IFA 进行检测, 确定了该抗体的中和效价。试验方法参考了欧盟猪瘟诊断标准操作手册, 该抗体在 1 mg/mL 浓度下的中和效价为 1:12, 中和效价不高, 可能是由于单克隆抗体只能识别一个抗原表位,

所以中和效价偏低。

我们已经证实了该抗体的反应性和抑制病毒复制的能力, 并且有较好的亲和力。因此, cHQ06 在检测方面的应用具有很高的研究价值。在下一步研究中, 我们计划应用 cHQ06 抗体建立竞争 ELISA 检测方法, 为开发新型 CSFV 抗体检测试剂奠定基础。

### REFERENCES

- [1] Ji W, Guo Z, Ding NZ, et al. Studying classical swine fever virus: making the best of a bad virus. *Virus Res*, 2015, 197: 35-47.
- [2] Becher P, Ramirez RA, Orlich M, et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 2003, 311(1): 96-104.
- [3] Collett MS, Moennig V, Horzinek MC. Recent advances in pestivirus research. *J Gen Virol*, 1989, 70(2): 253-266.
- [4] Thiel HJ, Stark R, Weiland E, et al. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, 1991, 65(9): 4705-4712.
- [5] Rumenapf T, Meyers G, Stark R, et al. Molecular characterization of hog cholera virus. *Arch Virol (Suppl)*, 1991, 3: 7-18.
- [6] Li Y, Wang JM, Kanai R, et al. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): 6805-6810.
- [7] Wang Z, Nie YC, Wang PG, et al. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, 2004, 330(1): 332-341.
- [8] Reimann I, Depner K, Trapp S, et al. An avirulent chimeric *Pestivirus* with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 2004, 322(1): 143-157.



- [9] Risatti GR, Borca MV, Kutish GF, et al. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J Virol*, 2005, 79(6): 3787–3796.
- [10] Beer M, Goller KV, Staubach C, et al. Genetic variability and distribution of classical swine fever virus. *Anim Health Res Rev*, 2015, 16(1): 33–39.
- [11] Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, et al. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, 1993, 67(9): 5435–5442.
- [12] König M, Lengsfeld T, Pauly T, et al. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995, 69(10): 6479–6486.
- [13] Wensvoort G, Terpstra C, de Kluijver EP, et al. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet Microbiol*, 1989, 21(1): 9–20.
- [14] Sandomenico A, Leonardi A, Berisio R, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against a cyclic variant of hepatitis C virus E2 epitope 412–422. *J Virol*, 2016, 90(7): 3745–3759.
- [15] Angus AG, Patel AH. Immunotherapeutic potential of neutralizing antibodies targeting conserved regions of the HCV envelope glycoprotein E2. *Future Microbiol*, 2011, 6(3): 279–294.
- [16] Edward S, Sands JJ. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1990, 97(2): 79–81.
- [17] Hou Q, Peng WP, Sun Y, et al. Expression of the truncated E2 protein-encoding gene of classical swine fever virus in *Escherichia coli* and preparation of a monoclonal antibody against E2 protein. *Chin Vet Sci*, 2008, 38(1): 1–5 (in Chinese). 侯强, 彭伍平, 孙元, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区编码基因的原核表达及其单克隆抗体的制备. *中国兽医科学*, 2008, 38(1): 1–5.
- [18] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol*, 1938, 27(3): 493–497.
- [19] Peng WP, Hou Q, Xia ZH, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library. *Virus Res*, 2008, 135(2): 267–272.
- [20] Steplewski Z, Sun LK, Shearman CW, et al. Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(13): 4852–4856.
- [21] Shaw DR, Khazaeli MB, Sun LK, et al. Characterization of a mouse/human chimeric monoclonal antibody (17-1A) to a colon cancer tumor-associated antigen. *J Immunol*, 1987, 138(12): 4534–4538.
- [22] Hashimoto Y, Tada M, Iida M, et al. Generation and characterization of a human-mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(1): 91–95.
- [23] Ji S, Jiang M, Yan B, et al. The chimeric monoclonal antibody MHCSZ-123 against human von Willebrand factor A3 domain inhibits high-shear arterial thrombosis in a Rhesus monkey model. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 111.
- [24] Yoo D, Provchy J, Park C, et al. Automated high-throughput protein purification using an ÄKTA purifier and a CETAC autosampler. *J Chromatogr A*, 2014, 1344: 23–30.
- [25] Wang FM, Yu F, Zhao MH. A method of purifying intact complement factor H from human plasma. *Protein Expr Purif*, 2013, 91(2): 105–111.

(本文责编 陈宏宇)