

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

基于非洲猪瘟病毒 p35 蛋白间接 ELISA 方法的建立及单克隆抗体制备

硕士研究生: 施磊

学 号: 82101185296

指 导 教 师: 田占成 副研究员

申请学位类别: 兽医硕士

培 养 单 位: 兰州兽医研究所

研究生院

2021 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

**Establishment of indirect ELISA and preparation of
Monoclonal Antibody based on African Swine Fever
virus p35 protein**

Candidate: SHI Lei

Student ID: 82101185296

Supervisor: Associate Prof TIAN Zhangcheng

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Institution: Lanzhou Veterinary Research Institute

Graduate School

June 2021

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它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了谢意。

研究生签名：施磊

时间：2021年6月2日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：施磊

时间：2021年6月2日

导师签名：田占成

时间：2021年6月2日

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		非洲猪瘟病毒 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性比较 及单克隆抗体制备				
论文作者		施磊	专业/领域	兽医	研究方向	不区分研究方向
指导教师		田占成		培养单位	兰州兽医研究所	
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	蔺国珍	副教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	西北民族大学生 命科学与工程学	预防兽医学	/
	王琦	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究	预防兽医学	
答 辩 主 席	曾巧英	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	甘肃省农业大学	预防兽医学	曾巧英
答 辩 委 员	贺奋义	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	甘肃省畜牧技术 推广总站	兽医学	贺奋义
	付宝权	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 兰州兽医研究所	预防兽医学	付宝权
	独军政	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 兰州兽医研究所	预防兽医学	独军政
	刘光远	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 兰州兽医研究所	预防兽医学	刘光远
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>		
会议记录(秘书)		刘文阁				
论文答辩时间地点		2021年5月21日于兰州兽医研究所综合楼5楼学术报告厅				

摘要

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染猪引起高度致死的接触性传染病。该病以软蜱为传播媒介, 非洲野猪为储存宿主。自非洲猪瘟疫情传入我国以来, 给我国养猪业的发展和社会经济的稳定带来严峻的挑战。ASF 具有复杂的感染与免疫逃避机制, 国内尚未研制出商业化的疫苗预防和控制该病。因此, 快速、准确、成本低廉, 相对便捷且适合大规模筛查的常规血清学诊断方法的建立, 对于 ASF 疫情的常态化监测显得尤为重要。

诊断抗原的抗原性及其有效单克隆抗体的研制, 对血清学诊断方法的建立至关重要。以 ASFV pp62 蛋白作为诊断抗原建立的间接 ELISA 方法, 针对保存较差的田间血清样品, 其检测效果显著优于以 p30 或 p54 蛋白建立的间接 ELISA 方法, p35 蛋白是 pp62 多聚蛋白经 ASFV S273R 蛋白酶水解后形成的成熟蛋白, 主要参与 ASFV 核衣壳的组装和病毒粒子的稳定过程。因此, 本研究首次以 ASFV p35 成熟蛋白为研究靶标, 分析了 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性, 并制备了 p35 蛋白的单克隆抗体。研究内容及结果概括如下:

1. 为了验证 p35 蛋白作为诊断抗原的潜力, 本研究通过建立酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法, 以杆状病毒昆虫细胞表达系统表达的 ASFV p30 蛋白为参照, 首次探讨原核表达系统表达的 ASFV p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性和潜力。间接免疫荧光和免疫印迹结果表明, 获得了 40 kDa 的重组 p35 蛋白和 30 kDa 的 p30 蛋白, 两种蛋白与 ASFV 阳性血清均具有较好的免疫反应原性。分别用重组 p30 和 p35 蛋白作为诊断抗原建立 ELISA 方法, 并验证其敏感性、稳定性以及与进口试剂盒的符合率。结果显示, 尽管 p35-ELISA 方法的检测敏感性稍低于 p30-ELISA 方法, 但其敏感性仍可达 95.8%, 且 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的批内和批间变异系数均小于 10%。p35-ELISA 方法与进口试剂盒比较, 符合率达 97.2%。结果表明建立的 p35-ELISA 方法稳定性好且敏感性高, 可应用于田间 ASFV 感染的检测。

2. 以纯化的 p35 蛋白作为抗原免疫小鼠, 当小鼠血清的抗体效价达到 1:204800 时, 取脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。用建立的 p35-ELISA 方法对杂交瘤细胞经过筛选和亚克隆后获得 15 株稳定分泌 p35 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞; 免疫印迹和间接免疫荧光方法鉴定其中的杂交瘤细胞 2-D7E5 和 3-F7E8 分泌的单克隆抗体, 获得的单克隆抗体能够特异地识别 p35 抗原; 抗体亚类鉴定结果表明: 两株单抗均为 IgG1 型, 轻链均是 Kappa; 间接 ELISA 方法测定制备的腹水效价均大于 2^{14} 。本研究为 p35 蛋白功能表位的解析和 ASF 血清学诊断方法的建立提供重要生物原材料。

关键词: 非洲猪瘟病毒, p30 蛋白, p35 蛋白, 单克隆抗体制备

Abstract

African classical swine fever (ASF) is a highly lethal contagious disease caused by African classical swine fever virus (ASFV) in pigs. The disease is transmitted by soft ticks and the African wild boar is used as the storage host. Since the epidemic of classical swine fever in Africa was introduced into China, it has brought severe challenges to the development of pig industry and social and economic stability in China. In addition, ASF has complex mechanisms of infection and immune escape, so commercial vaccines have not been developed to prevent and control the disease in China. Therefore, the establishment of routine serological diagnosis method which is rapid, accurate, low-cost, relatively convenient and suitable for large-scale screening is particularly important for the regular surveillance of ASF epidemic situation.

The antigenicity of diagnostic antigens and the development of effective monoclonal antibodies are very important for the establishment of reliable serological diagnostic methods. The indirect ELISA method using ASFV pp62 protein as diagnostic antigen is significantly better than the indirect ELISA method based on p30 or p54 protein for poorly preserved field serum samples. ASFV p35 protein is a mature protein originated from pp62 polyprotein cleaved by ASFV S273R protease. It is mainly involved in the assembly of ASFV nucleocapsid and the stabilization of virions. Therefore, the diagnostic antigenicity of p35 protein was firstly confirmed by using ASFV p35 mature protein as the research target, and the monoclonal antibody against p35 protein was prepared in the study. The contents and results of the study are as follows:

1. In order to verify the potential of p35 protein as a diagnostic antigen, the antigenicity and potential of ASFV p35 protein expressed in prokaryotic expression system as diagnostic antigen were discussed for the first time by establishing enzyme-linked immunosorbent assay (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) with reference to ASFV p30 protein expressed in baculovirus insect cell expression system. The results of indirect immunofluorescence and immunoblotting showed that the recombinant p35 protein of 40 kDa and the p30 protein of 30 kDa were obtained. Both proteins and ASFV positive serum had good immunogenicity. ELISA methods were established by using recombinant p30 and p35 proteins as diagnostic antigens, and their sensitivity, stability and coincidence with imported kits were verified. The results showed that although the sensitivity of p35-ELISA method was slightly lower than that of p30-ELISA method, the sensitivity was still 95.8%, and the intra- and inter-assay coefficients of variation of p35-ELISA method and p30-ELISA method were less than 10%. Compared with the imported kit, the coincidence rate of p35-ELISA method was 97.2%. The results showed that the established p35-ELISA method was stable and sensitive, and could be used to detect ASFV infection in the field.

2. Mice were immunized with the purified p35 protein, when antibody titer against p35 protein achieved 1 : 204800, the collected splenocytes are fused with SP2/0 myeloma cells. Hybridoma cells were screened by the established p35-ELISA method and were subcloned, and 15 strains of hybridoma

cells stably secreted monoclonal antibodies were obtained. The results of Western blot and indirect immunofluorescence indicated that 2-D7E5 and 3-F7E8 named monoclonal antibody can specifically recognize p35 antigen; The obtained monoclonal antibodies can specifically recognize the p35 antigen; the antibody subclass identification results showed that the two monoclonal antibodies are both IgG1 subtype, and the light chain is Kappa; The ascites titers measured by indirect ELISA method are all greater than 2^{14} . This study provides important biological raw materials for the analysis of p35 protein functional epitopes and the establishment of ASF serological diagnostic methods.

Keywords: African swine fever virus, P30 protein, P35 protein, Monoclonal antibody preparation

目 录

第一章 绪论	1
1.1 ASFV 概况	1
1.2 ASF 病原学检测技术	1
1.2.1 病毒分离 (VI) 和血细胞吸附 (HAD) 试验	2
1.2.2 抗原检测技术	3
1.2.3 ASFV 基因组检测	3
1.3 血清学诊断技术	3
1.3.1 酶联免疫吸附试验	4
1.3.2 免疫印迹试验 (WB)	4
1.4 单克隆抗体技术	5
1.4.1 单克隆抗体的原理	5
1.4.2 单克隆抗体在 ASF 诊断和防治中的应用	5
1.5 研究目的及意义	6
第二章 非洲猪瘟病毒 P35 蛋白间接 ELISA 方法的建立	8
2.1 实验材料	8
2.1.1 质粒、细胞、菌株 / 毒株及动物	8
2.1.2 主要药品及试剂	8
2.2 实验方法	8
2.2.1 ASFV p35 基因和 p30 基因的获取	8
2.2.2 ASFV p35 重组蛋白的制备	9
2.2.3 ASFV p30 重组杆状病毒的制备	10
2.2.4 ASFV p35 和 p30 重组蛋白的免疫印迹和间接免疫荧光鉴定	10
2.2.5 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的建立	11
2.3 结果与分析	12
2.3.1 重组质粒的构建及鉴定	12
2.3.2 重组蛋白的表达和鉴定	13
2.3.3 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的建立及比较	14

2.4 讨论.....	17
第三章 非洲猪瘟病毒 P35 蛋白单克隆抗体的制备.....	18
3.1 实验材料.....	18
3.1.1 引物.....	18
3.1.2 质粒、菌株、细胞及动物.....	18
3.1.3 主要药品及试剂.....	19
3.2 实验方法.....	19
3.2.1 免疫原的制备.....	19
3.2.2 小鼠免疫及抗体效价测定.....	19
3.2.3 ASFV p35 重组杆状病毒的制备.....	19
3.2.4 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备.....	19
3.2.5 免疫脾细胞的制备.....	20
3.2.6 饲养细胞的制备.....	20
3.2.7 细胞融合及筛选.....	20
3.2.8 阳性杂交瘤细胞的亚克隆.....	20
3.2.9 小鼠腹水制备.....	20
3.2.10 单克隆抗体的效价测定.....	21
3.2.11 单克隆抗体的亚类鉴定.....	21
3.2.12 单克隆抗体特异性鉴定.....	21
3.3 结果.....	21
3.3.1 p35 重组杆状病毒的构建.....	21
3.3.2 p35 蛋白免疫小鼠血清效价检测.....	22
3.3.3 细胞融合与亚克隆.....	22
3.3.4 Western-blot 检测.....	23
3.3.5 间接免疫荧光分析.....	23
3.3.6 单克隆抗体亚类鉴定和腹水效价测定.....	24
3.4 讨论.....	24
第四章 结论.....	26

致 谢	34
作者简介	35

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
ASFV	African swine fever virus	非洲猪瘟病毒
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	良伊格尔培养基
DIF	Direct immunofluorescence technique	直接免疫荧光技术
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附剂测定
EU	European Union	欧洲联盟
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HAD	Hemadsorption	红细胞吸附
IIF	Indirect Immunofluorescence	间接免疫荧光
IPT	Indirect immunoperoxidase tests	间接免疫过氧化物酶测试
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖
LB	Luria-bertini medium	LB 培养基
NPLs	national reference laboratories	国家参考实验室
OD	Optical density	光密度
OIE	Office international des épizooties	世界动物卫生组织
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
Sf9	Spodoptera frugiperda cell	昆虫卵巢细胞
TMB	3,3',5,5' -tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
UPL	Universal Probe Library	通用探针库
VI	Virus isolation	病毒分离
WB	Western blot	蛋白免疫印迹

第一章 绪论

1.1 ASFV 概况

非洲猪瘟 (ASF) 是猪最复杂的传染性疾病之一。ASF 具有致死率高、传播速度快的特点, 对猪和猪肉产品的国际贸易产生巨大的经济影响, 世界动物卫生组织 (OIE) 将其列为法定报告疫病, 在我国属于一类疫病。ASFV 呈直径 200 nm 的同心圆结构, 二十面体对称, 有囊膜的双链 DNA 病毒, 是非洲猪瘟病毒科的唯一成员 (ALONSO et al., 2018; 林彦星 等, 2018)。ASFV 根据其编码衣壳蛋白 P72 的 B646L 基因被分为 24 种不同的基因型 (QUEMBO et al., 2018)。

自上个世纪以来, ASF 在非洲国家 (MULUMBA et al., 2019) 和撒丁岛 (JURADO et al., 2018; LADDOMADA et al., 2019) 开始流行, 2007 年非洲猪瘟传播至位于欧亚接壤的高加索地区, 而后迅速传播到其他邻国 (ROWLANDS et al., 2008), 2014 年传播到欧洲联盟 (EU)。2007 年以来, 非洲猪瘟在俄罗斯爆发, 并向周边国家不断蔓延, 给欧洲和亚洲地区带来了巨大的威胁。立陶宛和波兰在 2014 年 1 月和 2 月报告了首批感染野猪病例, 随后是拉脱维亚和爱沙尼亚分别在 6 月和 9 月报告了 ASF 感染病例 (CARMINA et al., 2014)。在波罗的海三国和波兰, ASF 已成为野猪种群中的地方病, 防控工作更加困难 (MITEVA et al., 2020; PRZEMYSŁAW et al., 2019)。2018 年 8 月, ASFV 表现了跨境和跨洲跳跃传播的巨大能力, 中国距离先前已知的感染地区几百公里, 但 ASFV 迅速传播, 在中国境内确认了 149 起 ASF 疫情, 不到一年时间中国便扑杀了 100 多万头猪 (王颖 等, 2018)。这表明了全世界 ASF 流行病学状况的新变化, ASF 可能已经达到全球范围。ASF 不断向其他亚洲国家传播, 越南、蒙古、柬埔寨和香港以及最近的朝鲜, 均已确认检测到 ASF, 这将使控制传播变得更加困难 (ALBETKOVA et al., 2019)。

尽管 ASF 在近一个世纪前被首次描述, 但由于该病毒结构复杂、编码毒力蛋白多、能在单核/巨噬细胞内复制以及宿主免疫逃避等特点 (CARRILLO et al., 1994), 迄今仍未研制出有效的疫苗和治疗方法, 致使控制这种疾病难度较大。ASF 的传播只能通过早期发现和严格遵守经典疾病控制方法来预防, 包括监测, 流行病学调查, 追踪感染猪, 扑杀受感染的牲畜, 严格检疫和生物安全措施以及控制动物流动。成功的监测, 必须有快速、便捷、灵敏的诊断方法支持, 以此可以及早发现疾病, 从而减少 ASFV 传播 (ARIAS et al., 2017; Mur L. 等, 2016)。越来越多的快速、便捷、敏感的 ASF 诊断检测技术已成功地应用于监测、控制和根除计划。然而, 没有一种检测方法的敏感性和特异性是 100% 可靠的。尽管非洲猪瘟疫苗开发难度较大, 且检测方法也不够准确, 但通过人们不懈努力, 一些试验性疫苗和相对准确的检测方法不断出现, 并表现出一定的防控效果。本文主要针对 ASF 的诊断方法和单克隆抗体进行综述, 以期对 ASF 的防控提供思路与方向。

1.2 ASF 病原学检测技术

由于 ASF 通常表现为最急性或急性病型, 在特异性抗体出现前, 发病猪已经死亡, 被动监视是早期检测最直接、最有效的方法 (SOLENNÉ et al., 2013)。从疑似、患病或死亡动物身上采集样本 (血

液和靶器官)进行检测,以此来确认是否有 ASFV 感染。因此,病毒学检测对于迅速实施控制措施至关重要。病原学检测方法包括通过 PCR 检测病毒基因组,通过抗原 ELISA 或直接免疫荧光试验(DIF)检测病毒抗原以及使用病毒分离进行病毒检测(GALLARDO et al., 2015)。

表 1-1 非洲猪瘟病原学诊断方法

Table 1-1 Etiological diagnosis of African Swine Fever

检测类型	检测方法	使用范围
病毒分离	病毒分离/红细胞吸附试验	首次爆发确诊
抗原检测	直接免疫荧光试验	个体检测
	夹心 ELISA	监测和群体检测
普通 PCR	PCR	监测个体和群体检测
	ASF-CSF 多重 PCR	ASF 和 CSF 共同流行区域
	Taqmana 探针	监测个体和群体检测
	UPL 探针	监测个体和群体检测
实时定量 PCR	INGENE(Commercial)	监测个体和群体检测
	TETRACORE dried down(Commercial)	监测个体和群体检测
	ASF-CSF 多重实时 PCR	ASF 和 CSF 共同流行区域

1.2.1 病毒分离(VI)和血细胞吸附(HAD)试验

病毒分离(virus isolation)是非洲猪瘟首要的病原学诊断技术。主要从 ASFV 病毒载量大的死亡猪中获得的病毒分离株是诊断的关键步骤。从自然暴发中收集到的所有 ASFV 均可在猪源的易感原代白细胞培养物中分离,主要从猪血液、肺(肺泡)单核细胞或巨噬细胞中分离出来。如果猪样品中存在 ASFV,它将在细胞中复制并产生细胞病变效应(CPE)和溶血吸附反应(HAD)(刘显强, 2019),这是 ASFV 感染细胞的特征,此特征广泛用于病原学诊断中(BUSTOS2011; L et al., 1976)。在猪病中,只有 ASFV 能够在白细胞培养物中进行血吸附,使得在 ASF 初次暴发时,将 HAD 分析作为验证性试验(GALLARDO et al., 2019; NETHERTON et al., 2013)。Gallardo 等在分离 ASFV 时提到,尽管采集的野外样品中 ASFV 的 DNA 值很高,但分离病毒的效率较低。原因在于采集的野外样本保存不佳,影响了病毒的复制和存活能力。另外,一些田间毒株不产生 HAD,而仅产生 CPE(BOINAS et al., 2004; Gallardo C. 等, 2019)。这些非 HAD 病毒不容易分离,需要使用 PCR 或 DIF 试验对细胞培养物进行进一步确认(OURA et al., 2013)。

尽管在初次爆发或发生 ASF 的情况下,将 VI 和 HAD 试验的结果作为参考(OURA et al., 2013; PHIRI et al., 2003),但这也可能是最可靠的方法。该方法比其他技术更昂贵,在人员素质、技术条件、生物安全条件等方面要求严苛,只能在农业部规定的实验室开展。然而,尽管有各种限制,但病毒分离对于获得病毒库仍用于将来的分子和生物学表征研究是必不可少的。

1.2.2 抗原检测技术

抗原检测技术已广泛用于疾病的诊断。其中，直接免疫荧光技术（Direct immunofluorescence technique）是标记免疫技术中发展最早的一种，用于检测器官涂片或冷冻切片中的病毒抗原，可用于从非 HAD 毒株的 VI 中鉴定 ASFV。DIF 是一种快速检测技术，对 ASFV 的 HAD 和非 HAD 株具有特异性和敏感性 (BOTIJA1971; OURA et al., 2013)。由于在感染后第一周出现抗体应答时，抗原-抗体复合物的存在，该技术的灵敏度会显著下降，从而出现假阴性结果 (ARIAS et al., 2008)。

商业生产的抗原 ELISA 试剂盒是当前唯一可用的 ELISA 检测试剂盒 (INGEZIM PPA DAS, 西班牙 Ingenasa)，组织和血清样品均可进行检测。但是，用该试剂盒对 277 份实验感染猪样品和野猪和家猪田间样品的检测结果显示，与 UPL-PCR 相比，商业抗原 ELISA 检测试剂盒的敏感性较差 (77.2%) (P. et al., 2016)。因此，DIF 或抗原 ELISA 应作为补充试验，与其他一些病毒学和血清学诊断技术结合使用。

1.2.3 ASFV 基因组检测

目前，PCR 被认为是早期检测疾病的“金标准”，由于其敏感性、特异性、稳定性较高，可检测来自家猪、野猪和蜱类的任何种类的临床样本中的 ASFV 基因组。

常用的检测 ASFV 核酸的方法有常规 PCR 和实时定量 PCR 在内的各种 PCR 技术，用于病毒核酸的扩增，还可以用于毒株的分型，特别是从非 HAD 毒株的 VI 中和低毒力毒株中鉴定 ASFV。目前，OIE 推荐的以及众多研究开发的 PCR 方法，大多是基于 VP72 编码区设计，该区是编码主要病毒蛋白的高度保守基因，可确保（潜在）能够检出 22 种 ASFV 基因型。欧盟国家参考实验室 (NRLs) 级别的通用探针库 (UPL) PCR 诊断便是基于 VP72 编码区设计。UPL-PCR 对于检测低毒力毒株和地病毒载量的样本具有更高的敏感性，即使在典型临床症状尚不明显的情况下，也可以更早地检测出 ASFV。新病毒分离株可能随时会出现，因此定期检测常规 PCR 技术的特异性非常重要。

现已开发出多重 PCR 检测技术，可在一次试验中对 ASFV 和其他猪病原体进行同时扩增和差异检测。尽管与单独检测 ASFV 病原的 PCR 方法相比，多重 PCR 检测技术灵敏度可能较低，但这些技术可用于存在 CSF 和有 ASF 入侵风险较高的地区以及两种病毒共同传播的情况下进行检测。恒温扩增检测技术是近年分子诊断研究热点，是其他 PCR 经济诊断的替代方法，且反应时间短，适合现场检测。虽然此技术敏感性低于其他 PCR 检测方法，但能够检测含有大量 ASFV 的病死猪样品。

近年来，用于 ASFV 基因组检测的 PCR 商业试剂盒数量大大增加。这些 PCR 方法必须按照国际指导标准对每种新的 ASF 商业化试剂盒进行评估和验证，以确保其特异性、灵敏度、精确度、稳定性。只有高敏感度的 PCR 检测方法可用于检测感染初期低病毒载量的样本和出现慢性或亚临床的动物。尽管能够用 PCR 方法做出诊断，但结果并不可靠，血清学检测仍将在识别感染动物中起关键作用。

1.3 血清学诊断技术

近 40 年来，血清学诊断由于其操作简单，成本相对较低以及需要少量专用设备而成为最常用的

诊断检测技术。血清学诊断不仅方法多样，而且微量、高效和快捷，并可对疾病的不同病程、新感染疾病的前期或疾病的治疗效果进行评价等。血清学诊断方法在弥补病原学诊断的缺陷方面，将起着愈来愈重要的作用。对于 ASF 诊断，鉴于没有针对 ASFV 的疫苗可用，因此抗体检测尤为重要。感染 ASFV 的猪或康复猪的抗体在体内可以维持很长的时间，甚至可以终身携带抗体。因此，基于抗体的监视对于检测存活的猪群，阐明 ASF 的流行病学特征以及检测低毒力 ASFV 的入侵至关重要。抗体检测方法的使用对于疾病的根除计划也至关重要。OIE 批准的当前基于 ASFV 抗体的检测涉及 ELISA 进行抗体筛选，通过免疫印迹（WB），间接免疫荧光（IIF）或间接免疫过氧化物酶测试（IPT）作为验证性试验。

表 1-2 非洲猪瘟血清学学诊断方法

Table 1-2 Method for serological diagnosis of African swine fever

检测类型	检测方法	使用范围
筛选方法	OIE 间接 ELISA	监测和群体检测
	阻断 ELISA	监测和群体检测
	间接 ELISA	监测和群体检测
	间接 ELISA	监测和群体检测
确证方法	OIE 免疫印迹	监测和群体检测
	间接免疫荧光试验	监测和群体检测
	间接免疫酶	监测和群体检测

1.3.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验（ELISA）是一种 OIE 规定针对国际贸易的指定试验，用于检测 ASFV 的特异性抗体。目前，市场上有多种商用 ELISA 试剂盒，主要分为间接 ELISA 和阻断 ELISA 两种方法，所用的抗原也不尽相同。

据报道，与病原分子学检测方法相比，ELISA 检测病毒感染后 7 ~ 12 天产生的抗体的灵敏度较低。然而，它对于检测病毒感染后 12 ~ 14 天的特异性抗体，检出率高，结果可靠，因此 ELISA 试验仍然是大规模血清学研究中最有用的技术。ELISA 方法敏感性强、快速、易于执行且经济，但是只能分析血清，这限制了其应用范围。若是样品保存出现腐败、变质等情况，其敏感性会大大减低，样品的质量对其结果的准确率影响也极大。通过使用 IPT 试验，可以分析除血清以外组织样品的提取液。尽管如此，应该优先开发标准化的 ELISA 方法，以检测组织提取物中的 ASF 病毒特异性抗体，以便更简单、可靠地评估受灾地区的流行病学状况。

1.3.2 免疫印迹试验（WB）

应按照世界动物卫生组织（OIE）（2019a）的建议，通过 IPT，IIF 或 IB 试验等方法确认 ELISA 试验的阳性结果。免疫印迹试验（WB）是一种快速灵敏的检测特异性抗体的检测方法，即利用已知抗原检测未知抗体的特异性反应。WB 是用 ASFV、重组蛋白等作为抗原与 ASFV 感染猪后获得的血

清发生阳性反应, 尽管此方法非常敏感, 但仅血清样品可用于 WB 试验。此外, 存在亚临床症状、慢性感染动物的 ASF 流行地区, WB 检测时会出现非特异性结果。在这种情况下, 应考虑 IIF 或 IPT 等验证性血清学诊断试验, 对 WB 的结果进行验证。IIF 和 IPT 都基于相同的原理, 并且需要使用感染了 ASFV 的 VERO 或 MS 细胞系。尽管存在这一局限性, 但由于 IPT 具有较高的灵敏度和特异性, 而且可以检测任何种类的样本, 这对于野猪的监视和控制程序尤其重要, 因此成为 ASF 血清学诊断的最佳试验方法。目前, IPT 技术是欧盟 NRL 中选定的验证性试验。

现代免疫分析方法和技术是基础生物学实验室、国家新发病、疾病净化等检测的重要工具, 许多检测方法和技术都是以抗体-抗原结合机制为基本原理建立的。

1.4 单克隆抗体技术

单克隆抗体 (monoclonal antibody, Mc Ab) 是 1975 年 Kohler 和 Milstein 利用细胞融合技术将绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合得到的 (KOHLENER et al., 1975)。单克隆抗体 (Mc Ab) 是针对抗原上的特定表位而设计的免疫球蛋白, 是许多分子免疫学研究的重要工具, 单克隆抗体已经成为大量实验室诊断试验的关键组成部分。单克隆抗体具有理化性状高度均一、特异性强、生物活性单一、能够无限传代繁殖等优点, 在疾病预防、检疫、诊断、治疗和流行病学调查等研究中发挥了巨大的作用 (李娇 等, 2011; 刘建文 等, 2003)。此外, 与单克隆试剂相比, 多克隆试剂生产相对简单, 成本较低, 但会导致批次之间存在差异。因此, 单克隆抗体使标准化和安全的免疫分析系统得以发展, 成为为研究大分子和细胞的有力工具, 也为临床诊断技术的发展奠定基础。

1.4.1 单克隆抗体的原理

单克隆抗体是一种单一特异性的抗体, 即针对某一特定的抗原表位由 B 细胞在体外永生代而产生的特异性抗体, 此技术建立杂交瘤细胞的基础上 (LITTLE et al., 2000; PETERSEN et al., 1989; SKOWICKI et al., 2016)。当免疫原引起体液免疫反应时, 机体会对抗原的不同表位产生不同的抗体来对抗, 每个抗体都是单个 B 细胞针对单个表位产生的。因此, 单个 B 细胞分泌产生的具有特异性的抗体被称为单克隆抗体 (任娟, 2014; 张琳琳, 2016)。将这种 B 细胞与骨髓瘤细胞融合便形成杂交瘤细胞。杂交瘤细胞通过用 HAT 和 HT 培养基进行选择性的初筛, 接着经过三次亚克隆化, 便能够获得很多理化性状高度均一、生物活性单一、与抗原结合的特异性强、能够长期传代的杂交瘤细胞株。这些杂交瘤细胞便可以稳定的分泌单克隆抗体。

1.4.2 单克隆抗体在 ASF 诊断和防治中的应用

单克隆抗体在成本、稳定性、敏感性和特异性方面远优于多克隆抗体, 因此, 单克隆抗体的研制对于 ASFV 编码蛋白的生物学功能研究、单克隆抗体阻断治疗药物制备和建立常规血清学诊断方法非常关键。

p72 蛋白是 ASFV 的主要结构蛋白, 相对分子质量为 73.2 kDa, 是 B646L(VP72)基因编码的关键抗原蛋白。在病毒感染的后期表达中, 对毒衣壳的形成起着非常重要的作用 (NEILAN et al., 2004)。

在缺乏疫苗的情况下, 控制措施在很大程度上依赖于核酸、抗原和抗体的检测。p72 具有高度的抗原性和免疫原性, 是免疫原性最强的 ASFV 蛋白之一(KOLLNBERGER et al., 2002), 这种特性为血清学诊断技术的开发奠定了基础。p72 的全长核苷酸序列能够在体外表达, 并在检测技术中用作抗原(FREIJE et al., 1993; LOPEZ-OTIN et al., 1990)。以 ASFV 全病毒粒子为抗原的抗 ASFV 单抗已研制成功, 其中大部分识别结构蛋白 p72(SANZ et al., 1985)。商业化生产的抗 p72 单抗(Ingenasa)已用于 ASFV 的抗原检测(VIDAL et al., 1997)。

p54 蛋白是一种跨膜蛋白, 在氮端附近含有一个潜在的跨膜区(RODRIGUEZ et al., 1994)。在病毒形态发生和病毒感染中, 参与病毒对易感细胞的吸附与进入。用 ASFV 病毒自然、实验感染或用 p54 蛋白接种的猪可以产生高水平的抗 p54 抗体(GALLARDO et al., 2009; LOKHANDWALA et al., 2016; NETHERTON et al., 2019)。此外, 针对 p54 的抗体最早出现在 10 天内, 并在受感染动物的血液中持续数周(BARDERAS et al., 2001; CUBILLOS et al., 2013)。因此 p54 基因成为血清学诊断分析的最佳 ASFV 抗原靶位之一。Weldu Tesfagaber 等(TESFAGABER et al., 2021)针对 p54 蛋白开发一种基于单克隆抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)用于 ASFV 抗体检测。该方法灵敏度为 92.5%, 特异性为 98.9%。与其他市售的封闭酶联免疫吸附试验(κ 值=0.912)相比, 显示出极好的一致性, 并且对其他猪病原体没有反应。可作为其他血清学检测的替代方法, 用于筛查可能的 ASFV 感染。

尽管以 ASFV 编码的部分蛋白获得了一些稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞(白晨雨 等, 2020; 曹琛福 等, 2015; 陈凌燕 等, 2020; 杨莎莎 等, 2020), 而且许多研制单抗的目的也是用作诊断试剂, 但是利用单抗制成标准化的诊断试剂盒并不多见, 市场上也难以见到国产化单抗诊断试剂盒。随着 ASFV 在我国的根深蒂固及毒力致弱的变异毒株出现, 在养猪场由其感染而引起的 ASF 致病性和临床症状变得更为复杂, 易于与其他传染性猪病的临床症状混淆, 使得猪场的防疫人员不能快速准确的判断 ASF 疫情的发生和及时地采取控制措施。因此, 成本低廉, 相对便捷且适合大规模筛查的常规血清学诊断方法的建立对于 ASF 疫情的常态化监测显得尤为重要。鉴于单克隆抗体在成本、稳定性、敏感性和特异性方面有诸多优势, 应充分利用其优势, 在动物新发病的防治和诊断方面发挥其巨大作用。

1.5 研究目的及意义

非洲猪瘟(ASF)是家猪和野猪的一种急性、热性、出血性、高度传染性疾病。非洲猪瘟病毒(ASFV)是一种大型、复杂的双链 DNA 病毒(GALINDO et al., 2017), 不同分离株毒力差异较大, 高毒力毒株感染后潜伏期 5 ~ 15 d, 死亡率达 10% ~ 100%; 中等毒力毒株发病急, 有一定的存活率; 低毒力毒株感染后无任何症状。根据世界动物卫生组织报告, 2020 年以来, 全球共有 27 个国家和地区发生 2660 起家猪和 9042 起野猪共 11702 起非洲猪瘟疫情(WU et al., 2020)。目前还没有针对 ASF 的有效治疗方案和商业化疫苗, 因此控制 ASF 主要依靠扑杀和防控(DIXON et al., 2019)。因此, 准确、及时地诊断 ASF 感染对控制疫情至关重要。已有多种实验室检测方法可用于检测 ASFV(BOSCH-CAMOS et al., 2020; DIXON et al., 2019), 这些实验室技术能够快速、准确地检测出 ASFV 和携带 ASFV 的动物。

根据世界动物卫生组织(OIE)的建议, 病毒分离是实验室诊断的黄金标准。但病毒分离既耗时、

费力,在人员素质、技术条件、生物安全条件等方面要求严苛,并不适用于 ASF 的监测和控制(OURA et al., 2013)。酶联免疫吸附试验是检测 ASFV 抗原的一种快速、方便的方法(OURA et al., 2013)。然而,它对亚急性病例或早期感染的病例缺乏敏感性,而且特异性较差,因此,ELISA 方法不能识别不同的病毒株(BOONHAM et al., 2014; OURA et al., 2013)。目前,检测 ASFV 最方便、最安全、最常用的技术是直接免疫荧光法(HEUSCHELE et al., 1973)、血吸附试验(HA)(MALMQUIST et al., 1960)和聚合酶链反应(PCR)。然而,这些方法不适合现场快速病毒检测(BOONHAM et al., 2014; IKENO et al., 2013; KHODAKOV et al., 2016)。等温扩增技术,如重组酶聚合酶扩增(RPA)、环介导的等温扩增和交叉引物扩增,已经成功地用于检测 ASFV(OURA et al., 2013)。最近,还开发了许多与免疫层析试条相结合的新型等温扩增分析方法,用于现场检测 ASFV(Yao Gao 等, 2018; 林彦星 等, 2020)。但与其他扩增技术一样,其分辨率取决于引物和模板之间的结合特异性,这限制了该技术的准确性(BOONHAM et al., 2014; HE et al., 2019)。目前 OIE 认可的 ASF 常规诊断方法包括血清学 ELISA 方法初筛后再通过免疫印迹的方法进一步确定(PASTOR et al., 1990; PASTOR et al., 1989)。OIE 认可的检测方法中的病毒抗原来源于活病毒,涉及到生物安全三级实验室处理大量活病毒的生物安全性问题(DIXON et al., 2019; GALLARDO et al., 2015)。因此,筛选出一些 ELISA 反应性最佳的 ASFV 诊断抗原,对于建立可靠的血清学诊断方法和避免不必要的生物安全问题至关重要(GALLARDO et al., 2006; GALLARDO et al., 2009)。与多克隆抗体相比,单克隆抗体在现代免疫诊断分析中的应用显示出特异性强、灵敏度高、能够无限传代繁殖等明显的优势,在疾病预防、检疫、诊断、治疗和流行病学调查等研究中发挥了巨大的作用。因此,单克隆抗体使标准化和安全的免疫分析系统得以发展,为临床诊断技术的发展奠定基础。

第二章 非洲猪瘟病毒 p35 蛋白间接 ELISA 方法的建立

ASF 给我国猪场养殖业造成毁灭性的打击,但随着田间 ASFV 毒株变异,出现了 ASF 疾病进程变的温和,死亡率下降的趋势,使得 ASF 传播控制更加困难。除了全面提高养猪场的生物安全防护水平之外,实行定点式拔牙清除感染猪群的方法来预防非洲猪瘟疫情的蔓延,已成为我国非洲猪瘟预防控制的重要措施。因此,分子诊断方法和血清学诊断方法在控制重大疫情蔓延初期发挥着至关重要的作用。分子诊断方法的高昂成本,繁琐操作和耗时等不利因素限制了养殖场的广泛使用,在血清学方法初筛的基础上采用分子诊断方法确证的防疫措施可能成为较好的诊断防控措施。诊断抗原的筛选对于建立有效便捷的血清学方法非常关键,诊断抗原的生物学特性直接决定了所建立血清学方法的特异性、敏感性和稳定性。诊断抗原的抗原性涉及到抗原蛋白的活性和裸露抗原表位的数量等诸多因素。因此,尝试采用不同表达系统获得诊断抗原以评价所获得的抗原作为诊断抗原的有效性成为必然,特别是血清学方法的敏感性对于非洲猪瘟病毒感染的早期确证至关重要。

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、细胞、菌株 / 毒株及动物

DH5 α 、BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态购自北京全式金生物技术有限公司。杆状病毒表达载体 pFastBacTM、pET-30a 载体、标准 ASFV 阳性血清和阴性血清均保存于国家非洲猪瘟区域(兰州)实验室。

BALB / c 小鼠购自兰州兽医研究所实验动物中心。

2.1.2 主要药品及试剂

Complete His-Tag Purification Resin 购自上海罗氏公司; INgezim PPA COMPAC 11.PPA.K.3 (5 plates kit, Lote/Batch:050819) 购自西班牙英吉纳公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自 Solarbio 公司。Cellfectin[®] II Reagent (昆虫细胞脂质体转染试剂)、PureLinkTM HiPure Plasmid Midiprep Kit、SuperSignalTM West Pico PLUS 化学发光底物购自 Thermo 公司; Plasmid Mini Kit I(200) (质粒抽提试剂盒)购自 Omega Bio-Tek 公司; Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Abcam 公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记山羊抗猪 IgG 购自南京巴傲得生物科技有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 ASFV p35 基因和 p30 基因的获取

2.2.1.1 p35 和 p30 基因表达引物设计

参照于 GenBank 中 ASFV (Pig/HLJ/18) 参考序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计带有 His 表达标签的 p35 基因表达引物 (p35F 和 p35R)、p30 基因表达引物 (p30F 和引入 His 表达标签序列的 p30R) 和重组杆状病毒穿梭质粒鉴定引物 (M13F 和 M13R)。引物及基因合成与测序均委

托擎科生物科技有限公司完成。

表 2-1 引物序列

Table 2-1 Primer sequence

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
p35F	GCGAATTCATGGGGAATGACCCGCCGGT	28
p35R	CTGTCTCGACTTAATGGTGATGATCCCCCTACCTTTTCCT	39
p30F	GCGAATTCATGGATTTTATTTTAAATA	27
p30R	TGTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGATGTTTTTTTTTTTAAAGTTTAAT	59
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	18
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGG	23

2.2.1.2 p35 和 p30 基因扩增

含有目的基因 p35 (934 bp) 和带有 His 表达标签的 p30 (636 bp) 基因的质粒 pUC57-p35、pUC57-p30 委托擎科生物科技有限公司完成。将目的基因的甘油菌液接种于 1 mL LB 液体培养基中, 37°C 220 r/min 过夜震荡培养, 然后按 1:100 比例接种到 30 mL LB/Amp 液体培养基中, 37°C 220 r/min 震荡培养 12 ~ 16 h 后离心收取菌体, 用 Plasmid Mini Kit I(200) (质粒抽提试剂盒) 提取质粒。以合成的引物对 p35 和 p30 基因进行 PCR 扩增, p35 反应程序为: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 58°C 30 s, 72°C 1.5 min, 34 个循环; 72°C 10 min。以合成的带有 His 表达标签的 ASFV p30 基因为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 48°C 30 s, 72°C 1.5 min, 34 个循环; 72°C 10 min。

2.2.2 ASFV p35 重组蛋白的制备

2.2.2.1 重组 p35 基因的构建

将 p35 基因胶回收产物与 pET-30a 载体用 EcoR I 和 Sal I 酶 37°C 酶切 5 h。切胶回收后, 与酶切好的 pET-30a 载体按摩尔比 1 : 8 用 T4 DNA 连接酶于 16°C 过夜连接。在连接产物转化至大肠杆菌感受态 DH5 α 后, 将其均匀涂到含 50 μ g/mL 卡那霉素抗生素的 LB 琼脂固体培养基上, 倒置平板, 37°C 恒温培养箱培养 14 h。

次日挑取单个菌落于 1 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 置于 37°C 恒温摇床上, 220 rpm 培养 6 h 后按 1 : 100 进行扩大培养后提取质粒, PCR 鉴定为阳性的菌液经天启生物科技有限公司测序正确后, 将其命名为 pET-30a-p35。

2.2.2.2 重组 p35 的诱导表达

将鉴定正确的阳性重组质粒转化至 BL21 感受态细胞, 将其命名为 pET-p35, 按上述转化方法转化, 挑取单菌落, 摇菌, 进行诱导表达。取 50 mL 离心管分为 6 组, 按 1 : 100 接种菌液 30 mL, 当 OD 值达到 0.6 ~ 0.8 时, 分别加入 IPTG 使终浓度分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 并设不加 IPTG 对照, 置于 37°C 恒温摇床上, 220 rpm 分别诱导培养 2 h、4 h、6 h、8 h 后, 5 000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。菌体用 PBS 洗两遍, 用 40 μ L PBS 重悬后加入 10 μ L 5 \times SDS-PAGE Loading Buffer, 100°C 金属浴加热 10 min, 用 SDS-PAGE 检测蛋白表达量。

2.2.2.3 p35 蛋白的可溶性分析

将 pET-p35 的菌液分别在 37°C 和 16°C 摇床上 220 rpm 诱导 6 h。诱导结束后, 8 000 rpm 离心 10 min, 沉淀菌体, 用 10 mL PBS 重悬后, 经超声仪破碎裂解菌体, 离心获得诱导上清和沉淀。分别取适量的上清和沉淀悬液制样, 用于 p35 蛋白的可溶性分析。

2.2.2.4 p35 蛋白的纯化

将 pET-p35 的菌液 500 mL 在 16°C 大量诱导后, 12 000 rpm 离心 10 min, 菌体用 10 mL NPI-10 重悬后, 在冰上裂解 10 min, 接着超声破碎 30 min。超声完成后, 4°C 12 000 rpm 离心 20 min, 收集上清按照 Ni-NTA Superflow Cartridge 手册在非变性条件下进行镍柱亲和层析纯化重组蛋白。

2.2.3 ASFV p30 重组杆状病毒的制备

2.2.3.1 构建 pFastBac-p30 重组质粒

将 p30 基因和 pFastBacTM 载体经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后, 按 2.2.2 的方法转入大肠杆菌感受态 DH5 α 中, 在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上筛选转化体, 提取质粒后委托天启生物科技有限公司测序验证, 将测序正确的质粒命名为 pFastBac-p30。

2.2.3.2 重组杆状病毒 Bac-p30 的制备

重组质粒 pFastBac-p30 转化至感受态 DH10BacTM, 经三次蓝白斑筛选, 挑取白斑摇菌, 用引物 M13-F 和 p30-R 对菌液进行 PCR 鉴定, 将鉴定正确的重组杆粒 DNA 提纯后命名为 Bacmid-p30。将 Bacmid-p30 转染 Sf9 细胞。细胞出现明显病变后, 病毒空斑试验测定感染细胞上清中的病毒滴度。

2.2.3.3 重组杆状病毒 Bac-p30 空斑分析

在感染前一天, 将 Sf9 细胞接入 12 孔细胞培养板中, 培养至 80%~90% 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗细胞两次; 重组杆状病毒 Bac-p30 上清在 4°C 5000 rpm 条件下离心 5 min, 去除细胞碎片后, 以 10 倍稀释至 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ 6 个稀释度, 分别加入每孔中, 每个稀释度设两个重复; 室温孵育 2 h 后, 弃去孔中液体, 加入 1 mL 40°C 用 Sf-900 II SFM 配置的 4% 琼脂糖凝胶, 待琼脂凝固后, 置于 28°C 细胞培养箱中培养孵育 7~10 d。当可以观察到空斑时, 于细胞孔中加入 10% 甲醛固定液固定 2 h 以上, 弃去孔中的琼脂糖凝胶, 加入结晶紫染色液, 染色 5 min, 进行空斑计数。

2.2.4 ASFV p35 和 p30 重组蛋白的免疫印迹和间接免疫荧光鉴定

分别取 40 μ L 纯化的 p35 蛋白和重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 昆虫细胞裂解上清, 加入 10 μ L 的 5 \times SDS Loading Buffer, 100°C 金属浴煮样 10 min, 然后冰浴 3 min, 进行电泳。将蛋白胶转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂乳室温封闭 2 h。以 ASFV 阳性血清 (1:500) 作为一抗, 并将阴性血清 (1:500) 设为阴性对照, 山羊抗猪 IgG (1:20 000) 作为二抗进行免疫印迹分析。用 SuperSignal West Pico 显色后, 于成像系统中拍照。

用重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 细胞作为检测组, 同时设杆状病毒感染的 Sf9 细胞作为空白对照组。细胞用 4% 的多聚甲醇固定, 0.1% Triton X-100 透化后, 加入 1% BSA 封闭液封闭 1 h。用小鼠抗 His 标签抗体 (1:200) 作为一抗, 室温孵育 1 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:1 000), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后,

进行间接免疫荧光分析，在倒置荧光显微镜下观察特异性绿色荧光的产生情况。

2.2.5 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的建立

2.2.5.1 反应条件的优化

按照常规间接 ELISA 的操作方法(仇薇 等, 2017), 通过方阵滴定法对最佳抗原包被量、最佳血清稀释倍数和最佳封闭液及作用时间进行摸索与优化。将纯化的重组 p35 蛋白以 5、2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的抗原量包被; 同时将适量重组杆状病毒 Bac-p30 感染昆虫 sf9 细胞 72 h 后收集的细胞裂解上清测定总蛋白浓度为 14.9 mg/mL , 将获得的蛋白用 PBS 缓冲液以 1:10、1:50、1:100 和 1:200 稀释后 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的抗原量包被, 将标准 ASFV 阴性和阳性血清做 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 和 1:6400 稀释。分别加入到 2% 脱脂乳或 1% BSA 封闭的 ELISA 酶标板中, 根据 ASFV 阴性和阳性血清的 OD_{450} 值及 P/N 值最大时选择合适的抗原包被量和最佳血清稀释倍数和封闭液。将 ASFV 阳性和阴性血清按最佳稀释度在 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 0.5、1.0 和 1.5 h, 根据阴性和阳性血清的 OD_{450} 值及 P/N 值选择合适的血清作用时间; 将山羊抗猪 IgG (1:20000) 加入 ELISA 板后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别作用 0.5、1.0 和 1.5 h, 根据 P/N 值选择合适的酶标二抗作用浓度和作用时间。

2.2.5.2 临界值的确定

在重组蛋白 p30 和 p35 为诊断抗原建立的最佳 ELISA 反应条件下, 通过实验室保存的 92 份田间非洲猪瘟阴性血清(经西班牙英吉纳公司的 ASFV 抗体检测试剂盒和 OIE 建议的 ASFV 荧光 PCR 检测均为阴性, 以公式: 临界值=阴性样品的平均 OD_{450} 值+3 \times 标准偏差(s), 确定临界值。当待检血清的 OD_{450} 平均值 $\geq x + 3s$, 则判定为阳性, 当 $\text{OD}_{450} < x + 2s$ 则判定为阴性, 介于二者之间则判定为可疑样品。

2.2.5.3 敏感性检测

使用 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法对用同一批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的血清样品进行检测, 从 1:100 起, 2 倍倍比稀释至 1:6400, 统计不同稀释倍数下二者的阳性率, 进行 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法检测灵敏度的比较。此外, 用 p35-ELISA 方法对 48 份 ASFV 感染血清进行检测, 计算其敏感性。

2.2.5.4 稳定性检测

按已建立的间接 ELISA 最佳反应体系和条件, 用同一批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的标准 ASFV 阳性血清样品进行检测; 用不同批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的标准 ASFV 阳性血清样品进行检测, 计算批内和批间样本的变异系数 CV, 评价批内和批间重复性试验的稳定性。

2.2.5.5 特异性试验

以上述建立的 ELISA 检测方法, 对 PPV、PRRSV、FMDV、SVA、PCV2 和 PCV3 的阳性血清以及 ASFV 阳性、阴性血清进行检测, 根据几种血清检测的 OD_{450} 值, 判定该 ELISA 检测方法的特异性。

2.2.5.6 符合率试验

同时用本研究建立的 p35-ELISA 方法和西班牙英吉纳公司非洲猪瘟抗体检测试剂盒对 48

份 ASFV 感染血清和 60 份健康血清进行检测，计算二者符合率。

2.3 结果与分析

2.3.1 重组质粒的构建及鉴定

2.3.1.1 p35 重组质粒的构建

合成的 p35 引物对 p35 基因进行 PCR 扩增，基因片段结果表明扩增出的片段与预期一致，片段大小为 934 bp。

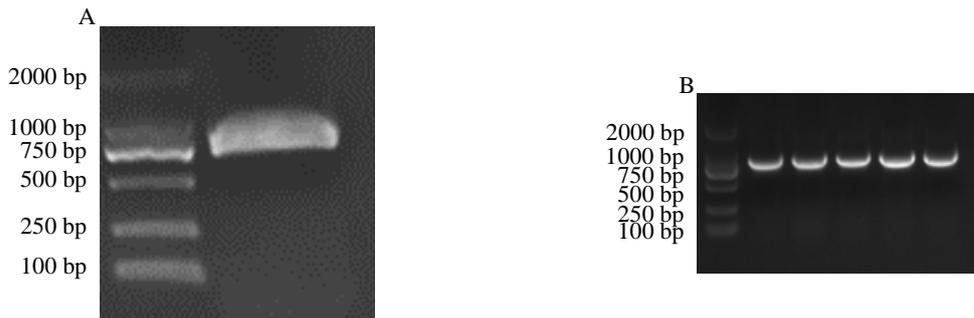


图 2-1 p35 重组质粒的构建

Figure 2-1 Construction of p35 recombinant plasmid

(A) p35 基因的 PCR 扩增；(B) p35 重组质粒的鉴定

(A) PCR amplification of p35 gene;(B) Identification of p35 recombinant plasmid

2.3.1.2 p30 重组质粒的构建

以合成的 p30 基因为模板，p30-F 和 p30-R 为引物扩增 p30 基因，获得约为 636 bp 的目的条带（图 A），与预期大小相符。对重组转移质粒 pFast-Bac-p30 进行 PCR 鉴定，成功扩增出一条 636 bp 的特异性条带，与预期大小相符（图 B）；对重组 Bac-p30 利用 M13-F 和 P35-R 引物进行 PCR 鉴定，可扩增得到 3196 bp（2560 bp + 636 bp）的目的条带（图 C），与预期片段长度一致，表明 p30 重组质粒构建成功。

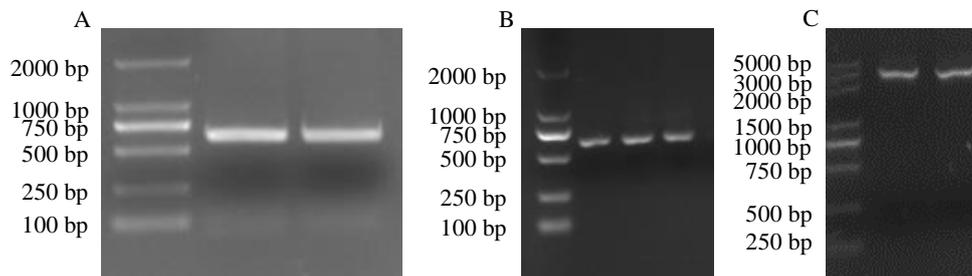


图 2-2 p30 重组质粒的构建

Figure 2-2 Construction of p30 recombinant plasmid

(A) p30 基因的 PCR 扩增；(B) p30 重组转移质粒的鉴定；(C) p30 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定。

(A) PCR amplification of p30 gene;(B) Identification of recombinant p30 transfer plasmid;(C) Identification of the p30 recombinant baculovirus shuttle plasmid.

2.3.2 重组蛋白的表达和鉴定

2.3.2.1 重组 p35 蛋白的诱导表达及鉴定

SDS-PAGE 结果显示, 部分重组 p35 蛋白以可溶性的形式表达, 通过非变性条件下的镍柱亲和层析纯化获得了纯度较高的重组 p35 蛋白, 分子量约为 40 kDa (图 A); 与阴性血清对照组相比, ASFV 阳性血清能够特异性识别纯化的重组 p35 蛋白 (图 B)。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果表明 p35 蛋白在原核表达系统中得以正确表达。

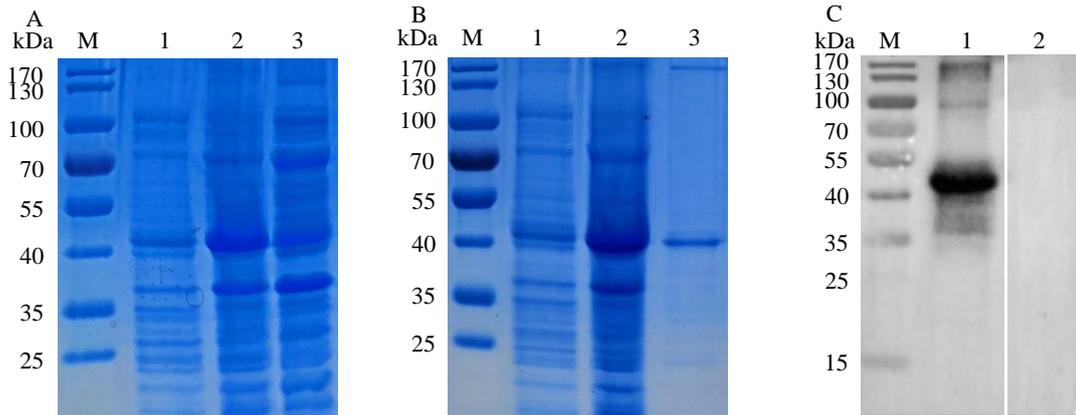


图 2-3 重组 p35 蛋白的表达鉴定

Fig. 2-3 Identification of the recombinant p35 protein.

(A) 重组 p35 蛋白 SDS-PAGE。M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导对照; 2: 诱导 6 h 包涵体表达样品; 3: 诱导 6 h 上清表达样品。(B) p35 蛋白纯化 SDS-PAGE。M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导对照; 2: 诱导 6 h 上清表达样品; 3: 纯化的重组 p35 蛋白。(C) ASFV 阳性血清对纯化的重组蛋白 p35 的反应性, M: 蛋白质分子质量标准; 1: ASFV 阳性血清; 2: ASFV 阴性血清。

(A) Recombinant p35 protein SDS-PAGE. M: Protein molecular weight standard; 1. No induced control; 2: Induction of inclusion body expression samples for 6 h; 3: Supernatant expression samples were induced for 6 h. (B) SDS-PAGE for purification of p35 protein. M: Protein molecular weight standard; 1. No induced control; 2: Supernatant expression samples were induced for 6 h; 3: Purified recombinant p35 protein. (C) Reactivity of ASFV-positive serum to purified recombinant protein p35, M: protein molecular weight standard; 1: ASFV positive serum; 2: ASFV positive serum.

2.3.2.2 重组 p30 蛋白的表达和鉴定

与正常 Sf9 细胞相比, p3 代重组杆状病毒 Bac-p30 感染 Sf9 细胞 72 h 后, 显微镜下可观察到明显的细胞病变, 主要表现为细胞生长缓慢, 开始膨大变成囊泡状, 裂解和脱落。间接免疫荧光结果表明: 杆状病毒感染的 Sf9 细胞作为对照组无特异性荧光出现, 但重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞在倒置荧光显微镜下出现特异性的绿色荧光 (图 A)。免疫印迹结果显示, ASFV 阳性血清能够特异性识别重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 细胞裂解上清中的 p30 抗原条带 (图 B)。

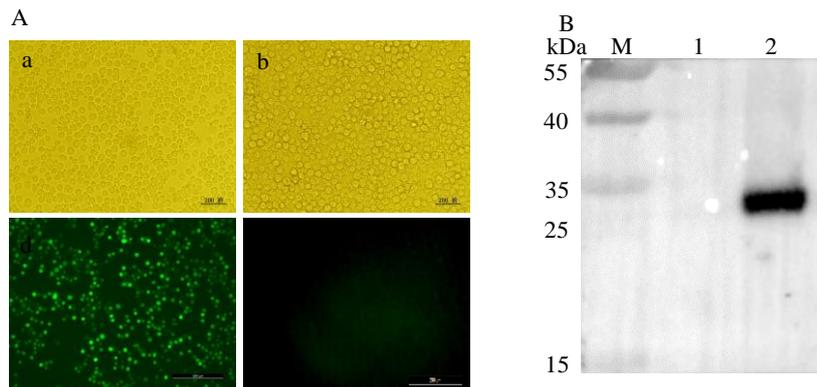


图 2-4 重组 p30 蛋白的表达鉴定

Fig. 2-4 Identification of the recombinant p30 protein by Western blotting.

(A) Bac-p30 感染 Sf9 细胞的细胞病变效应及间接免疫荧光分析。(a) 正常 Sf9 细胞；(b) 感染 Bac-p30 的 Sf9 细胞；(c) 感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞；(d) 感染 Bac-p30 的 Sf9 细胞。

(A) The cytopathic effect and indirect immunofluorescence assay of Sf9 cells infected with Bac-p30. (a) Normal Sf9 cells; (b) Sf9 cells infected with Bac-p30; (c) Sf9 cells infected with wild type baculovirus; (d) Sf9 cells infected with Bac-p30.

(B) M: 蛋白分子质量标准; 1: Sf9 细胞感染野生型杆状病毒; 2: Bac-p30 感染 Sf9 细胞的超声上清。

(B) M: Protein marker; 1: Sf9 cells infected with wild type baculovirus; 2: ultrasonic supernatant of Sf9 cells infected with Bac-p30.

2.3.3 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的建立及比较

2.3.3.1 反应条件的优化

根据得到的 ASFV 阳性血清和阴性血清 OD_{450} 值及 P/N 值可以得出本研究所建立的 p35-ELISA 方法的最适抗原包被量为 $2.5 \mu\text{g/mL}$, 1% BSA 作为封闭液封闭, 最适封闭时间为 45 min, 血清稀释倍数为 1:100, 酶标二抗的稀释倍数为 1:20 000, 最适酶标二抗封闭时间为 45 min 效果最佳; 将重组杆状病毒 Bac-p30 感染昆虫 Sf9 细胞获得的细胞裂解上清蛋白总浓度为 14.9 mg/mL 以 1:200 稀释后 $100 \mu\text{L/孔}$ 的抗原量包被, 1% BSA 作为封闭液封闭, 最适封闭时间为 1 h, 血清稀释倍数为 1:100, 酶标二抗的稀释倍数为 1:20 000, 最适酶标二抗封闭时间为 1 h, 产生的 P/N 值最大, 效果最佳。

2.3.3.2 临界值确定和敏感性检测

以建立的 p35-ELISA 方法对 92 份 ASFV 阴性血清样品进行检测, 平均 OD_{450} 值为 0.163 6, 标准差为 0.017 8, 确定的临界值为 0.217, 当待检血清 OD_{450} 值 ≥ 0.217 判定为阳性, 当 OD_{450} 值 < 0.199 判定为阴性 (表 2-2); p30-ELISA 方法对同一批次 ASFV 阴性血清样品进行检测, 平均 OD_{450} 值为 0.160 3, 标准差为 0.030 8, 按照公式计算其临界值为 0.253, 当待检血清 OD_{450} 值 ≥ 0.253 判定为阳性, 当 OD_{450} 值 < 0.222 判定为阴性 (表 2-3)。

通过 ASFV 阳性血清倍比稀释的方法比较 p30-ELISA 方法和 p35-ELISA 方法的检测灵敏度。结果表明, p30-ELISA 方法的检测敏感性稍高于 p35-ELISA 方法 (表 2-4)。在被检的 48 份 ASFV 感染血清中, p35-ELISA 方法有 46 份血清检测结果为阳性, 该方法的敏感性为 95.8%。

表 2-2 p35 间接 ELISA 临界值判定标准的确定

Table 2-2 Determination of the cut off value of the p35-ELISA

Critical value determination				
ELISA detection of ASFV as negative samples OD450	0.1307	0.1285	0.1634	0.1456
	0.1108	0.1713	0.1941	0.1428
	0.1505	0.1613	0.1839	0.1129
	0.169	0.1228	0.1014	0.1510
	0.1327	0.1726	0.1168	0.1883
	0.1159	0.2008	0.1405	0.1993
	0.1517	0.1525	0.1055	0.2168
	0.1302	0.1824	0.2128	0.2126
	Average value	0.1554		
Standard deviation	0.0334			
Result determination	≥0.2554 Judge as positive, <0.2221 Judge as negative			

表 2-3 p30 间接 ELISA 临界值判定标准的确定

Table 2-3 Determination of the cut off value of the p30-ELISA

Critical value determination				
ELISA detection of ASFV as negative samples OD 450	0.1566	0.1790	0.1937	0.1807
	0.1570	0.1585	0.1889	0.1627
	0.1234	0.1133	0.1606	0.1248
	0.1166	0.1147	0.1560	0.1322
	0.1205	0.1264	0.1297	0.1420
	0.1232	0.1282	0.1293	0.1381
	0.1592	0.1366	0.1401	0.1315
	0.1655	0.1414	0.1600	0.1313
	Average value	0.1452		
Standard deviation	0.0213			
Result determination	≥0.2090 Judge as positive, <0.1877 Judge as negative			

表 2-4 间接 p35-ELISA 和 p30-ELISA 的检测灵敏度比较

Table 2-4 Comparison of the sensitivity of the p35-ELISA and p30-ELISA

	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
p35 ELISA	+	+	+	+	+	-	-
p30 ELISA	+	+	+	+	+	+	+

注：+代表阳性；-代表阴性

2.3.3.3 稳定性评价

p35-ELISA 方法的批内变异系数在 1.42% ~ 7.40% 之间，批间变异系数在 0.58% ~ 1.71% 之间（表 2-5）。p30-ELISA 方法的批内变异系数在 0.39% ~ 3.39% 之间，批间变异系数在 0.87% ~ 3.58% 之间（表 2-6）。

表 2-5 p35-ELISA 的稳定性试验

Table 2-5 Stability test of the p35 -ELISA

Dilution ratio	p35 In-batch			p35 Batch-to-batch		
	Average value	Standard deviation	CV (%)	Average value	Standard deviation	CV (%)
1 : 100	1.725 6	0.024 5	1.42	1.725 6	0.024 5	1.42
1 : 200	0.882 0	0.017 9	2.03	0.882 0	0.017 9	2.03
1 : 400	0.634 0	0.022 3	3.52	0.634 0	0.022 3	3.52
1 : 800	0.435 3	0.032 2	7.40	0.435 3	0.032 2	7.40
1 : 1 600	0.267 0	0.005 0	1.87	0.267 0	0.005 0	1.87

表 2-6 p30-ELISA 的稳定性试验

Table 2-6 Stability test of the p30-ELISA

Dilution ratio	p30 In-batch			p30 Batch-to-batch		
	Average value	Standard deviation	CV (%)	Average value	Standard deviation	CV (%)
1 : 100	1.320 6	0.031 8	2.41	1.288 8	0.011 7	0.91
1 : 200	1.201 4	0.010 4	0.87	1.191 0	0.005 1	0.43
1 : 400	1.070 6	0.038 3	3.58	1.032 3	0.035 0	3.39
1 : 800	0.935 0	0.030 1	3.22	0.904 9	0.028 1	3.11
1 : 1 600	0.827 1	0.009 7	1.17	0.817 4	0.003 2	0.39

2.3.3.4 特异性试验

试验结果（表 2-7）显示，仅 ASFV 阳性血清的检测结果 OD450 值高于 0.22，为阳性，而 PPV、PRRSV、FMDV、SVA、PCV2 和 PCV3 的阳性血清检测的 OD450 值均低于 0.22，即为阴性，表明该检测方法具有良好的特异性。

表 2-7 间接 ELISA 的特异性

Table 2-7 Specificity of the indirect ELISA

	阴性血清	ASFV	PPV	PRRSV	FMDV	SVA	PCV2	PCV3
p35 ELISA	0.1630	1.693	0.0452	0.0424	0.0679	0.0802	0.0308	0.0642
p30 ELISA	0.1438	1.306	0.0395	0.0513	0.0708	0.079	0.0402	0.0664

2.3.3.5 符合率试验

对 108 份血清（48 份 ASFV 感染猪血清和 60 份健康猪血清）进行检测，结果显示，本研究建立的 p35-ELISA 抗体检测方法和西班牙英吉纳公司非洲猪瘟抗体检测试剂盒（ING）共有 105 份血清检测结果一致，符合率为 97.2%。

表 2-8 p35-ELISA 与进口试剂盒符合率试验

Table 2-8 Coincidence rate test of p35-ELISA with imported kit

p35-ELISA	ING		Total
	Positive	Negative	
Positive	45	1	46
Negative	2	60	62
Total	47	61	108

2.4 讨论

非洲猪瘟给我国乃至全球养猪业带来了毁灭性的打击(王颖 等, 2018)。在国际上还没有研发出针对 ASF 有效的疫苗和治疗方法之前, 分子诊断方法和血清学检测技术仍被认为是识别感染动物、根除潜在 ASFV 感染风险的主要手段(ARIAS et al., 2018; ZSAK et al., 2005)。尽管分子诊断方法对于 ASF 的早期诊断预防至关重要, 但血清学方法成本低廉和便捷的特点更适合于大规模的田间流行病学调查(GALLARDO et al., 2019; GALLARDO et al., 2015)。可靠的血清学诊断方法的建立与所选抗原的抗原性密切相关(GALLARDO et al., 2009; PEREZ-FILGUEIRA et al., 2006)。以前的研究表明, 在昆虫杆状病毒表达系统中制备的 ASFV 诊断抗原中, ASFV pp62 蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 方法针对保存较差的田间血清样品的检测结果优于以 p54 和 p30 蛋白为抗原靶标建立的 ELISA 方法(GALLARDO et al., 2009)。

为了进一步确认 pp62 蛋白水解产物 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性和潜力, 本研究采用原核表达系统表达了 p35 蛋白和昆虫杆状病毒表达系统表达 p30 蛋白, 以上述方法制备的抗原建立的 ELISA 诊断方法进行检测灵敏度的比较。获得了与预期理论蛋白分子量大小一致的 40 kDa 重组 p35 蛋白和 30 kDa 重组 p30 蛋白。制备的诊断抗原能与 ASFV 阳性血清发生特异性反应, 获得的 p30 蛋白和 p35 蛋白均具有较好的反应原性。在确定的最佳 ELISA 反应体系和条件下, 确定了 p30-ELISA 和 p35-ELISA 方法的临界值、检测灵敏度和批内和批间重复性试验的稳定性评价。原核表达系统制备诊断抗原的生产成本相对低廉, 制备的蛋白易于纯化, 稳定性较好, 适合大规模生产(POROWINSKA et al., 2013)。本研究在原核表达系统中制备 ASFV p35 重组蛋白, 通过与昆虫杆状病毒表达系统表达的 p30 重组蛋白在抗原性及其 ELISA 中的反应性进行对比分析。以原核表达纯化的 p35 抗原为基础建立的间接 ELISA 方法的检测灵敏度稍低于以昆虫杆状病毒表达系统制备的 p30 抗原为基础建立的间接 ELISA 方法。昆虫杆状病毒表达系统高效表达重组蛋白的同时能够正确折叠以维持表达蛋白的空间构象和蛋白活性, 而原核表达系统表达的蛋白仅展示线性表位。因此, 与原核表达的 p35 蛋白相比, 昆虫杆状病毒表达系统表达的 p30 蛋白可展示较多的线性和构象性表位, 这可能解释昆虫杆状病毒表达系统表达制备的 p30 重组蛋白作为诊断抗原时, p30-ELISA 方法的灵敏度稍高于原核表达系统制备的重组 p35 蛋白为包被抗原建立的 ELISA 方法。因此, 在后续的研究中可将 ASFV p35 蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中表达, 获得具有生物学活性的 p35 重组蛋白, 以便于该重组蛋白展示更多抗原表位用于提高重组 p35 蛋白诊断抗原的抗原性和检测灵敏度。尽管如此, 建立的 p35-ELISA 方法与进口试剂盒相比, 其符合率达到 97.9%, 可见, 所建立的 p35-ELISA 方法可用于田间 ASFV 抗体特异性检测。总之, 本研究中的原核表达系统制备的 p35 蛋白和昆虫杆状病毒表达系统制备的 p30 蛋白的反应原性较好, 建立的 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法检测灵敏度高且稳定性好, 两种方法均可用于田间 ASF 血清样本的流行病学调查。该研究为建立 ASF 血清学诊断方法制备优质诊断抗原提供了新的思路和物质基础。

第三章 非洲猪瘟病毒 p35 蛋白单克隆抗体的制备

目前, ASF 疫情的控制只能通过在养殖场落实严格的生物安全防控措施来避免 ASF 疫情的发生。此外, 猪场一旦暴发 ASF 疫情, 利用现有的 ASF 商品化分子诊断试剂盒检测和快速定点根除感染猪只的“拔牙式”控制措施成为我国早期 ASF 疫情发生控制的有效手段。随着 ASFV 在我国的根深蒂固及毒力致弱的变异毒株出现, 在养猪场由其感染而引起的 ASF 致病性和临床症状变得更为复杂, 易于与其他传染性猪病的临床症状混淆, 使得猪场的防疫人员不能快速准确的判断 ASF 疫情的发生和及时地采取控制措施。因此, 成本低廉, 相对便捷且适合大规模筛查的常规血清学诊断方法的建立对于 ASF 疫情的常态化监测显得尤为重要。单克隆抗体在成本、稳定性、敏感性和特异性方面远优于多克隆抗体, 因此, 单克隆抗体的研制对于 ASFV 编码蛋白的生物学功能研究、单克隆抗体阻断治疗药物制备和建立常规血清学诊断方法非常关键。

诊断抗原的生物学特性直接决定了所建立血清学方法的特异性、敏感性和稳定性, 研究抗原蛋白的活性和裸露抗原表位的数量等诸多特性有利于开发新的诊断抗原。在上一章节的研究中, 将 p35 作为诊断抗原, 其优势类似于 ASFV p30 蛋白。尽管 ASFV 编码的部分蛋白已制备出单克隆抗体, 但单独针对 ASFV p35 蛋白单克隆抗体的研制尚未报道。目前, ASFV p35 蛋白的晶体结构已被解析(LI et al., 2020), 但晶体结构上存在哪些重要的表位还不清楚。因此, 本研究以原核表达系统制备的重组 p35 蛋白免疫小鼠, 通过筛选鉴定获得能够稳定分泌 p35 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞, 以期对 p35 蛋白的功能表位解析和 ASF 血清学诊断方法的建立以及完善 p35 蛋白的晶体结构功能解析提供重要生物材料。

3.1 实验材料

3.1.1 引物

根据合成的 p35 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 p35 基因表达引物 (p35F 和 p35R), 在上下游引物 5'端加入酶切位点 *EcoR* I 和 *Sal* I; 用重组杆状病毒穿梭质粒鉴定引物 (M13F 和 M13R) 对重组 p35 穿梭质粒进行鉴定。引物和基因合成均委托擎科生物科技有限公司完成。

表 3-1 引物序列

Table 3-1 Primer sequence

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
p35F	GCGAATTCATGGGGAATGACCCGCCGGT	28
p35R	CTGTCGACttaCCCCCTACCTTTTCCT	28
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	18
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	23

3.1.2 质粒、菌株、细胞及动物

杆状病毒表达载体 pFastBac™, Sf9 昆虫细胞, 大肠杆菌 DH10Bac™ 菌株 SP2/0 骨髓瘤细胞、Sf9 细胞均保存于国家非洲猪瘟区域 (兰州) 实验室。BALB/c 小鼠由中国农业科学院兰州兽医研

究所实验动物中心提供。

3.1.3 主要药品及试剂

Cellfectin®II Reagent 和荧光二抗 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 购自 Invitrogen 公司, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自南京巴傲得生物科技有限公司, Grace's Insect Medium (1×)培养基、Sf-900™ II SFM (1×)培养基、骨髓瘤细胞培养液和细胞融合用培养试剂均购自 Sigma 公司, 抗体亚类鉴定试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

3.2 实验方法

3.2.1 免疫原的制备

本实验所用的免疫原为第二章中原核表达的 p35 融合蛋白, 将蛋白大量纯化后, 测定浓度, 将其分装, 于-80℃保存备用。

3.2.2 小鼠免疫及抗体效价测定

将 15 只 6~8 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 其中两组免疫纯化的 p35 蛋白, 另外一组设为空白对照。需要免疫三次, 程序如下所示: 第一次免疫用完全弗氏佐剂与免疫原乳化。将弗氏完全佐剂和 p35 蛋白的体积按 1:1 混合吸入乳化管中进行乳化。当乳化管发热时, 立即停止乳化, 将其放置冰上进行冷却, 目的是减少抗原因发热而降解。如此重复数次后, 直至混合物滴入清水中 2 min 内不溶解扩散为止。充分乳化后, 每只小鼠背部皮下多点免疫 200 μg/只, 总体积不超过 500 μl。第二次免疫与第三次免疫, 用不完全弗氏佐剂与等体积的 p35 蛋白乳化, 背部多点免疫 200 μg/只, 总体积不超过 500 μl。三免 7~10 天后, 小鼠尾尖采血 100 μl/只, 分离血清, 用第二章中建立的间接 p35-ELISA 方法检测抗体效价。

3.2.3 ASFV p35 重组杆状病毒的制备

按照第二章中 p30 重组杆状病毒制备的方法, 制备 p35 重组杆状病毒, 将其命名为 Bac-p35。将适量重组杆状病毒 Bac-p35 感染昆虫 Sf9 细胞 72 h 后, 收集的病毒感染的细胞, 用 NP-40 裂解液裂解细胞后, 收集裂解上清测定总蛋白浓度为 13.6 mg/mL, 将其分装冻存于-80℃备用。

3.2.4 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备

融合前复苏 SP2/0 骨髓瘤细胞, 用 8 mL 完全 1640 培养基培养。将细胞生长状态调整到最佳状态, 即细胞圆润透明、大小均一、边缘清晰时, 收集细胞进行活化。收集的细胞用 PBS 重悬, 细胞计数后, 每只小鼠注射 1×10^6 个细胞。10~14 d 后, 将小鼠安乐死, 摘取骨髓瘤。将骨髓瘤研磨后, 用 100 目的细胞滤网过滤, PBS 洗 2~3 次后, 计数。按每瓶 1×10^{10} 个细胞, 培养 6 瓶状态良好的 SP2/0 细胞准备细胞融合。

3.2.5 免疫脾细胞的制备

取抗体效价达到 1:409 600 的小鼠加强免疫, 3~5 d 后眼眶放血处死, 于 75% 酒精中浸泡消毒 5 min 后, 将其置于超净台解剖板上。用高压好的剪刀、镊子无菌取出小鼠脾脏, PBS 漂洗后, 放入盛有 10 mL 基础 1640 培养基的一次性培养皿中。用注射器针头将脾脏一端扎数个小孔, 然后用吸满培养基的注射器在脾脏另一端吹打, 将注射器中的液体尽数打入脾脏中。此时脾细胞会随培养基的注入从数个小孔中流出, 吹打数次后, 待脾细胞颜色变浅, 即脾脏破碎, 只剩被膜。用镊子将脾脏一端压住, 用无菌细胞刮反复刮脾脏被膜, 使残存的脾细胞刮取。接着用移液枪吹打液体, 使脾细胞吹散。用 100 目细胞筛过滤液体, 弃去杂质后, 1 000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 加入 10 mL 基础 1640 培养基, 离心后弃上清。如此清洗细胞两次。用适量基础 1640 培养基重悬脾细胞后计数备用。

3.2.6 饲养细胞的制备

取一只未免疫 BALB/c 小鼠, 眼眶放血处死, 于 75% 酒精中浸泡消毒 5 min 后。腹部朝上置于超净台内解剖板上, 无菌剪开腹部皮肤, 使腹膜完全暴露。酒精棉消毒后, 将 8 mL HAT 培养基用 10 mL 注射器注入腹腔, 用酒精棉球轻轻按压腹部 30 s 后, 慢慢吸出腹腔中的培养基注入 50 mL 无菌离心管中。如此重复 4 次, 补加培养基至 40 mL, 轻轻混匀。一只小鼠制备的饲养层细胞可以铺 4 块 96 孔细胞培养板, 50 μ L/孔, 置于 37°C 细胞培养箱中备用。

3.2.7 细胞融合及筛选

取抗体效价达到 1:204 800 的小鼠, 在细胞融合前 3 d 加强免疫。按常规方法进行细胞融合 (NELSON et al., 2000), 融合的细胞用 HAT 培养液混匀后以 100 μ L/孔加入提前铺好饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中, 置于 37°C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。培养至第四天, 每孔吸弃 50 μ L 液体, 加入 80 μ L HAT 培养液, 8 d 时, 将培养液换成 HT 培养液。当杂交瘤细胞生长至孔底面积的 1/5 时, 采用常规间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞阳性克隆。

3.2.8 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

将检测为阳性的杂交瘤细胞从孔内轻轻吹下, 计数后, 用 HT 培养基将细胞稀释至 10、30、50 个/mL。每个稀释度四个重复, 100 μ L/孔加入至提前铺好饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中。培养至第 4 天时半数换液, 每天观察孔内细胞生长情况并记录。待克隆后 10~14 d, 细胞长至孔底面积的 1/3~1/2, 用间接 ELISA 方法再次检测; 克隆 3 次后, 选阳性单克隆孔建株, 扩大培养后进行腹水制备, 并冻存。

3.2.9 小鼠腹水制备

选 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 6 只, 将收集扩大培养的阳性杂交瘤细胞, 1 000 rpm 离心 10 min, 用适量 PBS 重悬后, 腹腔注射杂交瘤细胞 10⁵~10⁶ 个/只。8~10 天后收集腹水, 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清备用。

3.2.10 单克隆抗体的效价测定

用 p35-ELISA 方法将腹水和杂交瘤细胞上清进行倍比稀释后作为一抗加入包被有抗原的酶标板中，并设置阳、阴性小鼠血清作为对照。以 $P/N > 2.1$ 作为阳性判定标准，对获得的阳性细胞株培养上清以及腹水进行抗体效价检测。

3.2.11 单克隆抗体的亚类鉴定

对筛选三次稳定分泌 p35 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，按照小鼠单克隆抗体 IgG 亚类鉴定 ELISA 试剂盒说明书进行鉴定。

3.2.12 单克隆抗体特异性鉴定

将重组杆状病毒表达的 p35 蛋白作为抗原，杂交瘤细胞培养上清作为一抗，SP2/0 细胞培养上清设为对照，HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗，Western blot 分析获得的单克隆抗体与 p35 蛋白的免疫反应原性；用重组杆状病毒 Bac-p35 感染 Sf9 细胞 48h 后，杂交瘤细胞培养上清用作一抗，Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1 : 1 000 稀释) 作为荧光二抗，进行间接免疫荧光分析。

3.3 结果

3.3.1 p35 重组杆状病毒的构建

按照第二章方法，构建 p35 重组杆状病毒。对重组转移质粒 pFast-Bac-p35 进行 PCR 鉴定，成功扩增出一条 934 bp 的特异性条带，与预期大小相符（图 A）；对重组 Bac-p35 利用 M13-F 和 M13-R 引物进行 PCR 鉴定，可扩增得到 3494 bp (2560 bp + 934 bp) 的目的条带（图 B），与预期片段长度一致，表明 p35 重组质粒构建成功。

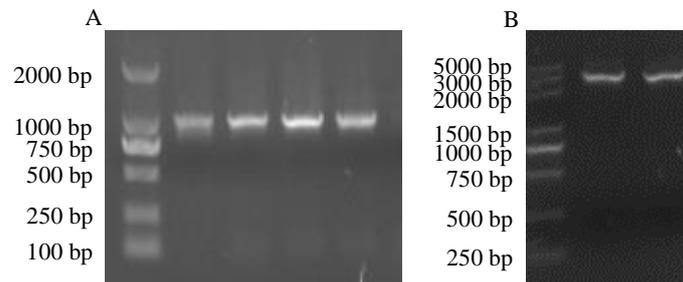


图 3-1 p35 重组质粒的构建

Figure 3-1 Construction of p35 recombinant plasmid

(A) p35 重组转移质粒的鉴定；(B) p35 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定。

(A) Identification of recombinant p35 transfer plasmid;(B) Identification of the p35 recombinant baculovirus shuttle plasmid.

3.3.2 p35 蛋白免疫小鼠血清效价检测

根据方阵滴定得出本研究建立间接p35-ELISA方法的条件是：浓度13.6 mg/mL杆状病毒表达的p35蛋白以1:200稀释时为最适抗原包被量，1% BSA作为封闭液封闭，最适封闭时间为1 h，血清稀释倍数为1:100，酶标二抗的稀释倍数为1:10 000，最适酶标二抗封闭时间为45 min 效果最佳，产生的P/N值最大。用血清稀释液将免疫小鼠血清稀释以1:100至1:409 600稀释，每孔100 μ L加入至酶标板中，然后进行常规的间接ELISA反应。测得有四只小鼠抗体效价达到1:204 800（图3-2），符合细胞融合的条件。

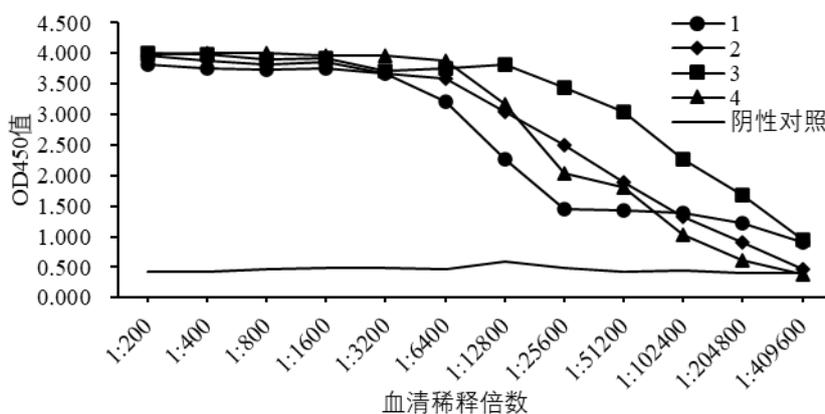


图 3-2 p35 蛋白免疫小鼠血清效价测定

Fig. 3-2 Determination of serum titer of mice immunized with p35 protein

3.3.3 细胞融合与亚克隆

细胞融合4 ~ 6 d后观察融合情况（图A），融合的杂交瘤细胞经间接ELISA方法筛选和亚克隆后（图B和C），获得了15株能够稳定分泌p35蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，将其中两株杂交瘤细胞命名为2-D7E5和3-F7E8。

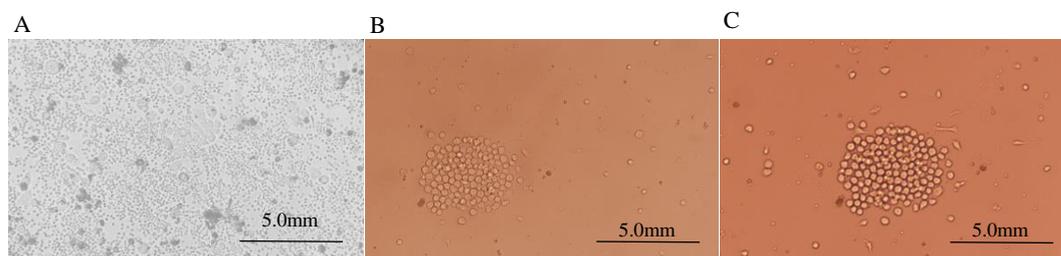


图 3-3 细胞融合与亚克隆

Figure 3-3 Cell fusion and subcloning

A. 细胞融合第五天; B. 2-D7E 亚克隆; C. 3-F7E8 亚克隆

A. Day 5 of cell fusion; B. 2-D7E subclone; C. 3-F7E8 subclone

3.3.4 Western-blot 检测

免疫印迹结果显示, p35 蛋白阳性血清能够特异地识别重组杆状病毒 Bac-p35 感染的 Sf9 细胞裂解上清中的 p35 抗原条带, 在野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞中无相应条带出现 (图 A); 2-D7E5 和 3-F7E8 杂交瘤细胞培养上清能够特异性识别 Bac-p35 病毒感染的 Sf9 细胞中的 p35 重组蛋白 (图 B, C), 而 SP2/0 骨髓瘤细胞培养上清作为阴性对照, 未出现相应的 p35 重组蛋白条带。

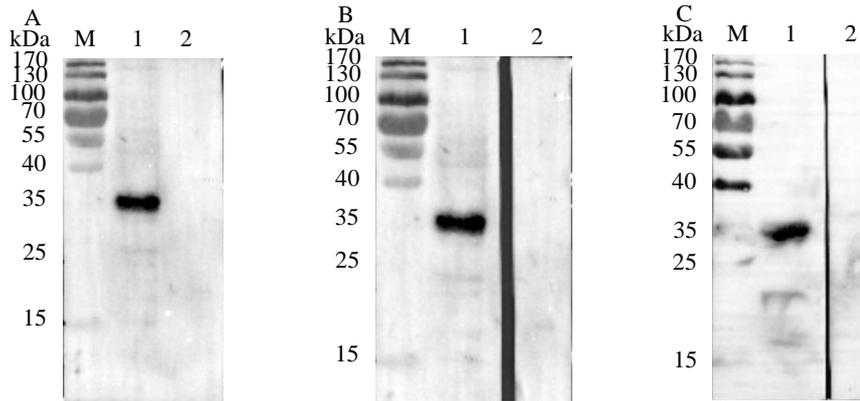


图 3-4 p35 多抗血清、单抗 Western blot 验证

A.p35 多抗血清的 Western blot 验证结果; B,C.单抗 2-D7E5 和 3-F7E8 Western blot 验证

Fig. 3-4 Western blot verification of p35 polyantiserum and monoclonal antibody.

A. Results of Western blot verification of p35 polyantiserum; B,C. 2-D7E5 and 3-F7E8 Western blot verification of monoclonal antibody.

3.3.5 间接免疫荧光分析

与正常 Sf9 细胞相比 (图 A), p3 代重组杆状病毒 Bac-p35 感染 Sf9 细胞 72h 后, 显微镜下可观察到明显的细胞病变 (图 B)。间接免疫荧光结果表明: 杆状病毒感染的 Sf9 细胞作为对照组无特异性荧光出现 (图 D), 但重组杆状病毒 Bac-p35 感染的 Sf9 细胞在倒置荧光显微镜下出现特异性的绿色荧光 (图 C); 杂交瘤细胞 2-D7E5 和 3-F7E8 培养上清检测组出现特异的绿色荧光 (图 E, F), 而阴性鼠血清对照组无特异性的荧光出现 (图 D)。

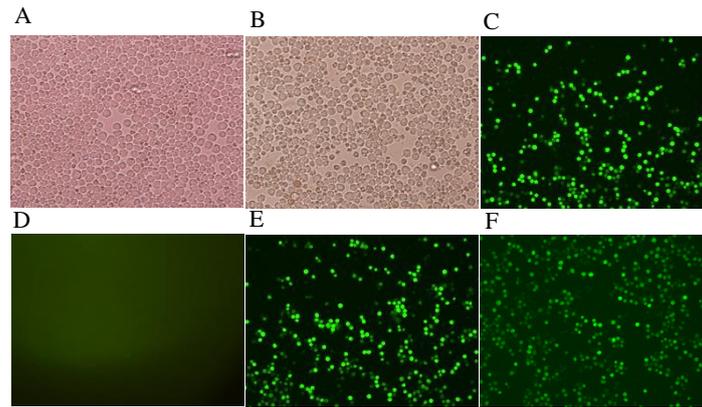


图 3-5 Bac-p35 感染 Sf9 细胞的细胞病变效应及间接免疫荧光分析

A.正常 Sf9 细胞；B.Bac-p35 感染的 Sf9 细胞；C,E,F.p35 多克隆抗体、2-D7E5 和 3-F7E8 培养上清分别与 p35 蛋白结合的 IFA 试验结果；D.阴性对照

Figure 3-5 Cytopathic effect and indirect immunofluorescence analysis of Sf9 cells infected with Bac-p35

A. Normal Sf9 cells; B. Sf9 cells infected with Bac-p35; C, E, F. IFA test results of p35 polyclonal antibody, 2-D7E5 and 3-F7E8 culture supernatant binding to p35 protein respectively; D. Negative control.

3.3.6 单克隆抗体亚类鉴定和腹水效价测定

对 2-D7E5 和 3-F7E8 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体进行亚类鉴定,结果表明:两者均为 IgG1。用间接 ELISA 测定腹水效价,结果表明:2-D7E5 和 3-F7E8 杂交瘤细胞制备的腹水效价均大于 2^{14} 。

表 3-2 单克隆抗体亚类鉴定和腹水效价

Table 3-2 monoclonal antibody subclass identification and ascites titer

杂交瘤细胞株	亚类	轻链	腹水效价
Hybridoma cell	Subclass	Light chain	Ascites titer
2-D7E5	IgG1	kappa	$>2^{16}$
3-F7E8	IgG1	kappa	$>2^{14}$

3.4 讨论

在过去的 100 年里 ASFV 已经成为全球养猪业的主要威胁。根据世界动物卫生组织报告,2020 年以来,全球共有 27 个国家和地区发生 2660 起家猪和 9042 起野猪共 11702 起非洲猪瘟疫情 (WU et al., 2020)。作为一种致命性极强的病毒,ASF 的发生必定会对疫区的生猪产业及全球猪肉市场产生极大冲击,造成不可估量的经济影响。

ASFV 病毒是一种胞质内复制的病毒,呈二十面体对称结果,编码大量的毒力蛋白 (ALEJO et al., 2018; WANG et al., 2019)。此外,ASFV 结构复杂、编码毒力蛋白多、宿主免疫逃避等特点,阻碍了 ASFV 病毒的疫苗开发 (TEKLUE et al., 2020)。严格的检疫、标准的生物安全措施和限制动物活动等方法对控制和限制疫病的传播显得尤为重要 (SANCHEZ-CORDON et al., 2018)。ASFV 感染猪后,抗 ASFV 的抗体在感染后很快出现,并持续数月甚至数年 (SANCHEZ-VIZCAINO et al., 2015),ASFV 抗体的检测是疾病诊断的突破口 (GALLARDO et al., 2009; OIE2015)。研制快

速而精准且适合于大规模筛查的诊断方法非常关键。因此，选择 ASFV 编码蛋白制备相应的高特异性单克隆抗体，为建立可靠的血清学诊断方法提供重要原材料迫在眉睫(郑丁丁等, 2020)。

ASFV 编码的结构蛋白大约有 50 多种，p35 成熟蛋白是其中重要的结构蛋白，在病毒粒子的包装和成熟过程中发挥重要作用(GALLARDO et al., 2009; OIE2015)。P35 蛋白作为前体多聚蛋白 pp62 水解切割而来的成熟蛋白(GERMÁN et al., 2002; JIA et al., 2017)，作为诊断抗原的抗原性方面类似于 p30 蛋白(施磊等, 2021)。在以前的研究中，以杆状病毒表达系统制备重组 pp62 蛋白免疫小鼠获得了一些能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞，其中针对 p35 蛋白获得了 3 株单克隆抗体(白晨雨等, 2020)。蛋白的生物学特性和空间构象是影响获得的单克隆抗体数量和种类的一个关键因素。我们推断，前体多聚蛋白 pp62 中的 p35 蛋白的空间构象可能与切割后的成熟 p35 蛋白空间构象不完全一致，这势必会影响获得的单克隆抗体的种类和数量。因此，本研究首次以原核表达纯化的 p35 蛋白作为抗原免疫小鼠，将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，以重组 p35 杆状病毒表达系统制备的重组 p35 蛋白作为抗原建立的间接 ELISA 方法进行杂交瘤细胞阳性克隆的筛选。经过三次亚克隆后，获得了 15 株稳定分泌 p35 单克隆抗体的杂交瘤细胞，选其中两株对其命名为 2-D7E5 和 3-F7E8 的杂交瘤细胞进行鉴定。间接 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹方法结果表明，两株单克隆抗体都能够特异地识别重组杆状病毒表达系统表达的 p35 蛋白，且腹水抗体效价均在 2^{14} 以上。

总之，本研究获得的杂交瘤细胞能够稳定分泌 p35 蛋白单克隆抗体，制备的 p35 蛋白单克隆抗体效价高、特异性好，可以为下一步解析非洲猪瘟病毒 p35 蛋白的重要表位及后续以单克隆抗体为原材料建立非洲猪瘟血清学诊断方法奠定基础。

第四章 结论

1. ASFV p35 蛋白作为诊断抗原建立的间接 ELISA 方法检测效果类似于以杆状病毒昆虫细胞表达系统表达的 ASFV p30 蛋白为诊断抗原建立的间接 ELISA 方法, 具有敏感性高和稳定性好的特点, 建立的 p35-ELISA 方法可应用于田间 ASFV 感染血清的检测。

2. 以原核表达纯化的 p35 蛋白免疫小鼠后, 通过杂交瘤技术得到 15 株杂交瘤细胞。2-D7E5 和 3-F7E8 单抗分泌的单克隆抗体能够特异识别重组杆状病毒表达系统表达的 p35 蛋白, 且制备的腹水效价分别为 1:65536 和 1:16384。本研究为 p35 蛋白功能表位的解析和 ASF 血清学诊断方法的建立提供重要生物原材料。

参考文献

- 白晨雨, 王同燕, 赵少若, 王衡, 郝丽影, 李雪锋, 白露露, 邓跃, 王孟月, 邓均华, 2020. 非洲猪瘟病毒p62蛋白单克隆抗体的制备及初步应用. 畜牧兽医学报, 51(05): 181-189.
- 曹琛福, 梁云浩, 吕建强, 张彩虹, 唐金明, 杨俊兴, 张桂红, 花群义, 2015. 非洲猪瘟病毒p54蛋白特定抗原表位单克隆抗体的制备. 中国兽医科学, (01): 75-79.
- 陈凌燕, 王孟月, 曹红梅, 郝丽影, 王景云, 张素玲, 吴芄, 李胜强, 邓均华, 田克恭, 2020. 非洲猪瘟病毒pK205R蛋白单克隆抗体的制备与鉴定. 畜牧与兽医, 52(9): 105-109.
- 李娇, 王艳, 唐娜, 沈志强, 2011. 猪瘟单克隆抗体诊断方法的研究概述. 养猪, (6): 93-96.
- 林彦星, 曹琛福, 杨俊兴, 阮周曦, 吴江, 吕建强, 花群义, 2018. 非洲猪瘟病毒实验室诊断方法的研究进展. 中国兽医学报, 38(10): 2020-2024.
- 林彦星, 吴江, 赵现锋, 史卫军, 刘建利, 曹琛福, 曾少灵, 阮周曦, 花群义, 2020. 非洲猪瘟病毒LFD-RPA快速检测方法的建立. 中国兽医科学, (8): 952-956.
- 刘建文, 涂长春, 2003. 单克隆抗体在动物病毒性传染病研究中的应用. 畜牧兽医科技信息, (5): 11-13.
- 刘显强, 2019. 非洲猪瘟的诊断要点. 畜牧兽医科技信息, (4): 17.
- 任娟, 2014. 杂交瘤技术与单克隆抗体. 新疆畜牧业, (4): 26-27.
- 施磊, 田占成, 杨吉飞, 高闪电, 独军政, 赵亚茹, 刘志杰, 关贵全, 刘光远, 罗建勋, 殷宏, 2021. 非洲猪瘟病毒p35蛋白作为诊断抗原的抗原性比较. 生物工程学报, 37(1): 187-195. DOI:10.13345/j.cjb.200359
- 王颖, 缪发明, 陈腾, 周鑫韬, 李楠, 吕宗吉, 张静远, 刘晔, 张国军, 张守峰, 扈荣良, 2018. 中国首例非洲猪瘟诊断研究. 病毒学报, 34(06): 817-821.
- 杨莎莎, 苗雨润, 薄宗义, 王振忠, 谭凯, 鲍晨沂, 吴晓东, 陈鸿军, 郑龙三, 钱莺娟, 2020. 非洲猪瘟病毒p30单克隆抗体的制备和鉴定. 中国兽医科学, (8): 976-981.
- 张琳琳, 2016. 杂交瘤技术制备单克隆抗体研究进展. 生物学教学, 41(8): 2-4.
- 仇薇, 侯力丹, 宋洁, 张爽, 李芸, 李晶, 孙蕾, 范文辉, 刘文军, 2017. 一种更灵敏的特异性检测H9N2型禽流感抗体的间接ELISA方法的建立. 生物工程学报, 33(08): 1253-1264.
- 郑丁丁, 逢文强, 王衡, 孙哲, 黄甜, 王彦伟, 郝丽影, 曹红梅, 李雪锋, 周莹, 白晨雨, 陈凌燕, 邓均华, 张桂红, 田克恭, 2020. 非洲猪瘟病毒p54蛋白单克隆抗体的制备与鉴定. 病毒学报, 36(06): 1143-1150.
- ALBETKOVA A, CHAIGNAT E, GASQUET P, HEILMANN M, ISADORE J, JASIR A, MARTIN B, WILCKE B, 2019. A Competency Framework for Developing Global Laboratory Leaders. *Frontiers in Public Health*, 7.
- ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, ANDRES G, 2018. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *J Virol*, 92(23). DOI:10.1128/JVI.01293-18.
- ALONSO C, BORCA M, DIXON L, REVILLA Y, ESCRIBANO J M, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology*, 99(5).

- ARIAS M, JURADO C, GALLARDO C, FERNANDEZ-PINERO J, SANCHEZ-VIZCAINO J M, 2018. Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transbound Emerg Dis*, 65 Suppl 1: 235-247. DOI:10.1111/tbed.12695.
- ARIAS M, JURADO C, GALLARDO C, FERNÁNDEZ-PINERO J, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, 2017. Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transboundary & Emerging Diseases*.
- ARIAS M, SANCHEZ-VIZCAINO J M, MORILLA A, YOON K J, ZIMMERMAN J J, 2008. *African Swine Fever Eradication: The Spanish Model*. John Wiley & Sons, Ltd.
- BARDERAS M G, RODRIGUEZ F, GOMEZ-PUERTAS P, AVILES M, BEITIA F, ALONSO C, ESCRIBANO J M, 2001. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol*, 146(9): 1681-1691. DOI:10.1007/s007050170056.
- BOINAS, F S, 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *Journal of General Virology*, 85(8): 2177.
- BOONHAM N, KREUZE J, WINTER S, van der VLUGT R, BERGERVOET J, TOMLINSON J, MUMFORD R, 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res*, 186: 20-31. DOI:10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- BOSCH-CAMOS L, LOPEZ E, RODRIGUEZ F, 2020. African swine fever vaccines: a promising work still in progress. *Porcine Health Manag*, 6: 17. DOI:10.1186/s40813-020-00154-2.
- BOTIJA C S, 1971. [Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence]. *Bulletin - Office international des épizooties*, 73(11): 1025-1044.
- BUSTOS M J, 2011. *Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples*. John Wiley & Sons, Inc..
- CARMINA G, JOVITA F P, VIRGINIA P, ISMAIL G, IWONA M D, GEDIMINAS P, RAQUEL N, PALOMA F P, SVETLANA B, OLEG N, 2014. Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 20(9): 1544-1547.
- CARRILLO C, BORCA M V, AFONSO C L, ONISK D V, ROCK D L, 1994. Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *Journal of Virology*, 68(1): 580-583.
- CUBILLOS C, GOMEZ-SEBASTIAN S, MORENO N, NUNEZ M C, MULUMBA-MFUMU L K, QUEMBO C J, HEATH L, ETTER E M, JORI F, ESCRIBANO J M, BLANCO E, 2013. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res*, 173(1): 159-167. DOI:10.1016/j.virusres.2012.10.021.
- DIXON L K, SUN H, ROBERTS H, 2019. African swine fever. *Antiviral Res*, 165: 34-41. DOI:10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
- DIXON L K, SUN H, ROBERTS H, 2019. African swine fever. *Antiviral Res*, 165: 34-41. DOI:10.1016/j.antiviral.2019.02.018.

- FREIJE J M, MUNOZ M, VINUELA E, LOPEZ-OTIN C, 1993. High-level expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the major structural protein (p72) of African swine fever virus. *Gene*, 123(2): 259-262. DOI:10.1016/0378-1119(93)90134-o.
- GALINDO I, ALONSO C, 2017. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*, 9(5). DOI:10.3390/v9050103.
- GALLARDO C, BLANCO E, RODRIGUEZ J M, CARRASCOSA A L, SANCHEZ-VIZCAINO J M, 2006. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*, 44(3): 950-956. DOI:10.1128/JCM.44.3.950-956.2006.
- GALLARDO C, FERNANDEZ-PINERO J, ARIAS M, 2019. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res*, 271: 197676. DOI:10.1016/j.virusres.2019.197676.
- GALLARDO C, FERNÁNDEZ-PINERO J, ARIAS M, 2019. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Research*, 271: 197676.
- GALLARDO C, NIETO R, SOLER A, PELAYO V, FERNÁNDEZ-PINERO J, MARKOWSKADANIEL I, PRIDOTKAS G, NURMOJA I, GRANTA R, SIMÓN A, 2015. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8): 2555-2565.
- GALLARDO C, NIETO R, SOLER A, PELAYO V, FERNANDEZ-PINERO J, MARKOWSKA-DANIEL I, PRIDOTKAS G, NURMOJA I, GRANTA R, SIMON A, PEREZ C, MARTIN E, FERNANDEZ-PACHECO P, ARIAS M, 2015. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *J Clin Microbiol*, 53(8): 2555-2565. DOI:10.1128/JCM.00857-15.
- GALLARDO C, NIETO R, SOLER A, PELAYO V, FERNANDEZ-PINERO J, MARKOWSKA-DANIEL I, PRIDOTKAS G, NURMOJA I, GRANTA R, SIMON A, PEREZ C, MARTIN E, FERNANDEZ-PACHECO P, ARIAS M, 2015. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *J Clin Microbiol*, 53(8): 2555-2565. DOI:10.1128/JCM.00857-15.
- GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, MALTA J, SOLER A, BLANCO E, PARKHOUSE R M, LEITAO A, 2009. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16(7): 1012-1020. DOI:10.1128/CVI.00408-08.
- GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, MALTA J, SOLER A, BLANCO E, PARKHOUSE R M, LEITAO A, 2009. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16(7): 1012-1020. DOI:10.1128/CVI.00408-08.
- GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, MALTA J, SOLER A, BLANCO E, PARKHOUSE R M, LEITAO A, 2009. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African

- swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16(7): 1012-1020. DOI:10.1128/CVI.00408-08.
- GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, MALTA J, SOLER A, BLANCO E, PARKHOUSE R M, LEITAO A, 2009. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16(7): 1012-1020. DOI:10.1128/CVI.00408-08.
- Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gómez C., Fernandez-Pinero J., Arias M., 2019. Attenuated and non-adamant adsorbing (non-AD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transboundary & Emerging Diseases*.
- GERMÁN, ANDRÉS, ALÍ, ALEJO, JOSÉ, SALAS, MARÍA, L., SALAS, 2002. African Swine Fever Virus Polyproteins pp220 and pp62 Assemble into the Core Shell. *J. Virol.*, 76(24): 12473-12482.
- HE Z, SU Y, LI S, LONG P, ZHANG P, CHEN Z, 2019. Development and Evaluation of Isothermal Amplification Methods for Rapid Detection of Lethal Amanita Species. *Front Microbiol*, 10: 1523. DOI:10.3389/fmicb.2019.01523.
- HEUSCHELE W P, HESS W R, 1973. Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. *Trop Anim Health Prod*, 5(3): 181-186. DOI:10.1007/BF02251387.
- IKENO S, SUZUKI M O, MUHSEN M, ISHIGE M, KOBAYASHI-ISHIHARA M, OHNO S, TAKEDA M, NAKAYAMA T, MORIKAWA Y, TERAHARA K, OKADA S, TAKEYAMA H, TSUNETSUGU-YOKOTA Y, 2013. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol*, 4: 298. DOI:10.3389/fmicb.2013.00298.
- JIA N, OU Y, PEJSAK Z, ZHANG Y, ZHANG J, 2017. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection. *Journal of Veterinary Research*, 61(2).
- JURADO C, FERNÁNDEZ-CARRIÓN E, MUR L, ROLESU S, LADDOMADA A, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, 2018. Why is African swine fever still present in Sardinia? *Transboundary & Emerging Diseases*.
- KHODAKOV D, WANG C, ZHANG D Y, 2016. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. *Adv Drug Deliv Rev*, 105(Pt A): 3-19. DOI:10.1016/j.addr.2016.04.005.
- KOHLER G, MILSTEIN C, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495-497. DOI:10.1038/256495a0.
- KOLLNBERGER S D, GUTIERREZ-CASTANEDA B, FOSTER-CUEVAS M, CORTEYN A, PARKHOUSE R, 2002. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J Gen Virol*, 83(Pt 6): 1331-1342. DOI:10.1099/0022-1317-83-6-1331.
- L, ENJUANES, A, L, CARRASCOSA, M, A, MORENO, E, UELA V, 1976. Titration of African swine fever (ASF) virus. *Journal of General Virology*, 32(3):471-477.
- LADDOMADA A, ROLESU S, LOI F, CAPPALÀ S, OGGIANO A, MADRAU M P, SANNA M L, PILO G, BANDINO E, BRUNDU D, 2019. Surveillance and control of African Swine Fever in free - ranging pigs in Sardinia. *Transboundary & Emerging Diseases*.

- LI G, FU D, ZHANG G, ZHAO D, RAO Z, 2020. Crystal structure of the African swine fever virus structural protein p35 reveals its role for core shell assembly. *Protein & Cell*, 11(836 – 843).
- LITTLE M, KIPRIYANOV S M, Le GALL F, MOLDENHAUER G, 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today*, 21(8): 364-370. DOI:10.1016/s0167-5699(00)01668-6.
- LOKHANDWALA S, WAGHELA S D, BRAY J, MARTIN C L, SANGEWAR N, CHARENDOFF C, SHETTI R, ASHLEY C, CHEN C H, BERGHMAN L R, MWANGI D, DOMINOWSKI P J, FOSS D L, RAI S, VORA S, GABBERT L, BURRAGE T G, BRAKE D, NEILAN J, MWANGI W, 2016. Induction of Robust Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens. *Clin Vaccine Immunol*, 23(11): 888-900. DOI:10.1128/CVI.00395-16.
- LOPEZ-OTIN C, FREIJE J M, PARRA F, MENDEZ E, VINUELA E, 1990. Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. *Virology*, 175(2): 477-484. DOI:10.1016/0042-6822(90)90432-q.
- MALMQUIST W A, HAY D, 1960. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res*, 21: 104-108.
- MITEVA A, PAPANIKOLAOU A, GOGIN A, BOKLUND A, WALLO R, 2020. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *Efsa Journal*, 18(1).
- MULUMBA M L K, SAEGERMAN C, DIXON L K, MADIMBA K C, KAZADI E, MUKALAKATA N T, OURA C A L, CHENAIS E, MASEMBE C, STÅHL K, 2019. African swine fever: Update on Eastern, Central and Southern Africa. *Transboundary & Emerging Diseases*.
- Mur L., Atzeni M., Martínez-López B., Feliziani F., Rolesu S., Sanchez-Vizcaino J. M., 2016. Thirty - Five - Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transboundary & Emerging Diseases* 63.2(2016):165-177.
- NEILAN J G, ZSAK L, LU Z, BURRAGE T G, KUTISH G F, ROCK D L, 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 319(2): 337-342. DOI:10.1016/j.virol.2003.11.011.
- NELSON P N, REYNOLDS G M, WALDRON E E, WARD E, GIANNOPOULOS K, MURRAY P G, 2000. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 53(3): 111-117. DOI:10.1136/mp.53.3.111.
- NETHERTON C L, GOATLEY L C, REIS A L, PORTUGAL R, NASH R H, MORGAN S B, GAULT L, NIETO R, NORLIN V, GALLARDO C, HO C S, SANCHEZ-CORDON P J, TAYLOR G, DIXON L K, 2019. Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens. *Front Immunol*, 10: 1318. DOI:10.3389/fimmu.2019.01318.
- NETHERTON, C. L, WILEMAN, T. E, 2013. African swine fever virus organelle rearrangements. *Virus Research An International Journal of Molecular & Cellular Virology*.
- OIE A H S, 2015. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Bulletin Office International Des Épizooties: 1092-1106.

- OURA C A L, EDWARDS L, BATTEN C A, 2013. Virological diagnosis of African swine fever—Comparative study of available tests. *Virus Research*, 173(1).
- SASTRE, P., GALLARDO, C., MONEDERO, A., RUIZ, T., ARIAS, M., 2016. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Veterinary Research*, 12(1).
- PASTOR M J, ARIAS M, ESCRIBANO J M, 1990. Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res*, 51(10): 1540-1543.
- PASTOR M J, LAVIADA M D, SANCHEZ-VIZCAINO J M, ESCRIBANO J M, 1989. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can J Vet Res*, 53(1): 105-107.
- PEREZ-FILGUEIRA D M, GONZALEZ-CAMACHO F, GALLARDO C, RESINO-TALAVAN P, BLANCO E, GOMEZ-CASADO E, ALONSO C, ESCRIBANO J M, 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol*, 44(9): 3114-3121. DOI:10.1128/JCM.00406-06.
- PETERSEN V B, FUKUMA N, MCLACHLAN S M, BRADBURY J, BEEVER K, DEVEY M E, BLEASDALE-BARR K M, PHILLIPS D I, BAYLIS P, RYLEY H, ET A, 1989. A human-mouse hybridoma which secretes monoclonal thyroglobulin autoantibody with properties similar to those of the donor patient's serum autoantibody. *Autoimmunity*, 4(1-2): 89-102. DOI:10.3109/08916938909034363.
- PHIRI O C, DWARKA R M, LUBISI B A C, NYAKAHUMA D, VOSLOO W, 2003. Support to Reinforcement of the Diagnostic Capacities and Control of African Swine Fever in Cameroon. Interim report on: Molecular epidemiological studies of African swine fever in Cameroon.
- POROWINSKA D, WUJAK M, ROSZEK K, KOMOSZYNSKI M, 2013. [Prokaryotic expression systems]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67: 119-129. DOI:10.5604/17322693.1038351.
- PRZEMYSŁAW, CWYNAR, JANE, STOJKOV, KLAUDIA, WLAZLAK, 2019. African Swine Fever Status in Europe. *Viruses*.
- QUEMBO, C. J, JORI, F., VOSLOO, W., HEATH, L., 2018. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transboundary & Emerging Diseases*.
- RODRIGUEZ F, ALCARAZ C, EIRAS A, YANEZ R J, RODRIGUEZ J M, ALONSO C, RODRIGUEZ J F, ESCRIBANO J M, 1994. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol*, 68(11): 7244-7252. DOI:10.1128/JVI.68.11.7244-7252.1994.
- ROWLANDS, J. R, 2008. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12): 1870-1874.
- SANCHEZ-CORDON P J, MONTOYA M, REIS A L, DIXON L K, 2018. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet J*, 233: 41-48.

- DOI:10.1016/j.tvjl.2017.12.025.
- SANCHEZ-VIZCAINO J M, MUR L, GOMEZ-VILLAMANDOS J C, CARRASCO L, 2015. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol*, 152(1): 9-21. DOI:10.1016/j.jcpa.2014.09.003.
- SANZ A, GARCIA-BARRENO B, NOGAL M L, VINUELA E, ENJUANES L, 1985. Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins. *J Virol*, 54(1): 199-206. DOI:10.1128/JVI.54.1.199-206.1985.
- SKOWICKI M, LIPINSKI T, 2016. [The development of methods for obtaining monoclonal antibody-producing cells]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 70: 367-379. DOI:10.5604/17322693.1200552.
- SOLENE, COSTARD, BRYONY, ANNE, JONES, BEATRIZ, MARTÍNEZ-LÓPEZ, LINA, MUR, ANA, 2013. Introduction of African Swine Fever into the European Union through Illegal Importation of Pork and Pork Products. *Plos One*, 8(4).
- TEKLUE T, SUN Y, ABID M, LUO Y, QIU H J, 2020. Current status and evolving approaches to African swine fever vaccine development. *Transbound Emerg Dis*, 67(2): 529-542. DOI:10.1111/tbed.13364.
- TESFAGABER W, WANG L, TSEGAY G, HAGOSS Y T, ZHANG Z, ZHANG J, HUANGFU H, XI F, LI F, SUN E, BU Z, ZHAO D, 2021. Characterization of Anti-p54 Monoclonal Antibodies and Their Potential Use for African Swine Fever Virus Diagnosis. *Pathogens*, 10(2). DOI:10.3390/pathogens10020178.
- VIDAL M I, STIENE M, HENKEL J, BILITEWSKI U, COSTA J V, OLIVA A G, 1997. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies. *J Virol Methods*, 66(2): 211-218. DOI:10.1016/s0166-0934(97)00059-1.
- WANG N, ZHAO D, WANG J, ZHANG Y, WANG M, GAO Y, LI F, WANG J, BU Z, RAO Z, WANG X, 2019. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly. *Science*, 366(6465): 640-644. DOI:10.1126/science.aaz1439.
- WU K, LIU J, WANG L, FAN S, LI Z, LI Y, YI L, DING H, ZHAO M, CHEN J, 2020. Current State of Global African Swine Fever Vaccine Development under the Prevalence and Transmission of ASF in China. *Vaccines (Basel)*, 8(3). DOI:10.3390/vaccines8030531.
- ZSAK L, BORCA M V, RISATTI G R, ZSAK A, FRENCH R A, LU Z, KUTISH G F, NEILAN J G, CALLAHAN J D, NELSON W M, ROCK D L, 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43(1): 112-119. DOI:10.1128/JCM.43.1.112-119.2005.

致 谢

迎春花还未凋零，牡丹花已褪去颜色，我们追着春天的尾巴踏进兽研所的大门，怀揣梦想与希冀，再次相遇。时光荏苒，流光过隙，伴随着毕业论文的提交，过去的数载时光至此落下帷幕。时而笑谈一周过的好快，时而抱怨一周太过漫长，不知不觉三年已过。还记得哈尔滨打雪仗的日子，还记得兽研所冬至包饺子的时刻，元旦活动中获得一等奖时我无比兴奋，感觉来到这里是幸运的，是最正确的选择。我还没准备好，还有许多科研原理没有理解，还有些许实验技术没有掌握，还没有让自己变得成熟，还有……此时此刻我想说，很幸运可以成为外寄生虫与虫媒病团队的一员，让我在互帮互助，团结向上，朝气蓬勃，气氛融洽的团队里不断学习，不断成长，不断进步，不断充实自我，逐渐从科研小白成长为可以帮助师弟师妹的师兄。谨以此机会，向所有帮助过我的老师、同学、朋友及家人致以最诚挚的感谢和祝福。

衷心感谢我的研究生导师—田占成副研究员，在我面对科研难题的时候，是您给予我指导和帮助；在我实验失败的时候，是您给予我包容和安慰；在实验结果不理想时，是您帮我分析原因所在。感谢您在我进步时，给予的鼓励；感谢您在我沮丧时，给予的安慰和关心。同时也非常感谢独军政老师和高闪电老师，谢谢老师们在我们对实验感到迷茫时，及时替我们拨开云雾见日明；谢谢老师们教导我们科研思维和为人处世的道理，让我们成为一个更独立的自己。祝愿我们病毒组在今后的日子里越来越好，越来越壮大，步履不停，思路不止，文章不断！

特别感谢殷宏研究员、罗建勋研究员、刘光远研究员、关贵全研究员、李有全研究员、刘志杰副研究员、刘军龙副研究员、牛庆丽副研究员对我实验研究过程中提供的宝贵建议和帮助。尤其感谢杨吉飞副研究员提供的非洲猪瘟阳性血清和非洲猪瘟进口诊断试剂盒，给我实验提供了很大的帮助。

感谢任巧云师姐、刘爱红师姐、罗金师兄、王锦明师兄、刘文阁师兄、李志师兄、马全英师姐、王晓星师姐在实验技术和论文研究过程中提供的无私帮助和宝贵建议。

特别感谢康棣师姐、周亚红师姐、张忠辉师兄、丁晓攀师兄、车永军师兄教我实验技能，帮我解决实验过程中遇到的种种困难，感谢我的同窗张璐、师弟范亚亚、师妹户鑫兵在我实验过程中给予的无私帮助。

感谢李贺海、吕照勇、王兆贵、谭阳春、孙浩、仇晓飞、王佳慧等同学的帮助。

感谢敬爱的父母，不论是精神上的，还是物质上，一直默默的支持我，他们的支持我才走的更远、看的更高。

最后由衷感谢百忙之中抽出宝贵时间帮我评阅论文和参加答辩的各位专家、教授。

本论文是在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完成的，得到中国农业科学院科技创新工程项目（Grant No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI-03）的联合资助，特此致谢！

作者简历

施磊，男，汉族，1995年2月出生，甘肃张掖人。2014年9月至2018年6月就读于西南大学动物科技学院动物医学专业，获农学学士学位。

2018年9月考入中国农业科学院研究生院攻读硕士学位，2018年5月至2020年6月在中国农业科学院兰州兽医研究所外寄生虫与虫媒疫病创新团队完成硕士学位论文相关工作。在硕士期间发表论文有：

(1)施磊，周亚红，田占成，高闪电，独军政，关贵全，刘光远，罗建勋，殷宏，2020. 基因I型乙型脑炎病毒病毒样颗粒的制备及其对小鼠的免疫原性分析. 畜牧兽医学报. 51(6): 1391-1398. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2020.022.

(2)施磊，田占成，杨吉飞，高闪电，独军政，赵亚茹，刘志杰，关贵全，刘光远，罗建勋，殷宏，2021. 非洲猪瘟病毒 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性比较. 生物工程学报. 37(1): 187-195. DOI:10.13345/j.cjb.200359.