

分类号: S852.651

学校代码: 10410

密 级:

学 号: 0222019001

江西农业大学

全日制专业学位硕士学位论文



非洲猪瘟病毒 P72 蛋白单克隆抗体的制备及 双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立

Generation of monoclonal antibody against ASFV P72 protein and preliminary establishment of DAS-ELISA for detection

申 请 人: 钱新杰

指 导 教 师: 张锦华 教授

校外指导教师: 谈华松 兽医师

学 位 种 类: 兽医硕士

专 业 领 域: 无

所在培养单位: 动物科学技术学院

论文提交日期: 二零二二年六月

本研究课题来源

- 1、企业横向课题，20200410，非洲猪瘟监测与预警分析（2020.04-2021.05）
- 2、江西省教育厅，江西省教育厅科技计划项目，GJJ190192，EP0 诱导细胞凋亡的分子机制及其对天然免疫的影响（2019.12 至今）
- 3、江西省科技厅，江西省科技计划项目，20202BAB205004，非洲猪瘟病毒 P72 蛋白抑制 I 型干扰素产生的机制研究（2020.08 至今）

Funding

1. Enterprise Horizontal Project, 20200410, African Swine Fever monitoring and early warning analysis (2020.04-2021.05)
2. Jiangxi Provincial Department of Education, Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Department of Education, GJJ190192, Molecular mechanism of APOPTOSIS induced by EP0 and its effect on natural immunity (December, 2019-present)
3. Science and Technology Department of Jiangxi Province, Science and Technology Project of Jiangxi Province, 20202BAB205004, Inhibition mechanism of African Swine Fever virus P72 protein on type I interferon production (2020.08-present)

独创性声明

本人声明,所呈交的学位论文,是在指导教师指导下,通过我的努力取得的成果,并且是自己撰写的。尽我所知,除了文中作了标注和致谢中已经作了答谢的地方外,论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果,也不包含在江西农业大学或其它教育机构获得学位或证书而使用过的材料。与我一同对本研究做出贡献的同志,都在论文中作了明确的说明并表示了谢意。如被查有严重侵犯他人知识产权的行为,由本人承担应有的责任。

学位论文作者亲笔签名: 钱新杰 日期: 2022 年 6 月 20 日

论文使用授权的说明

本人完全了解江西农业大学有关保留、使用学位论文的规定,即学校有权送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅;学校可以公布论文的全部或部分内容,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密,在____年后解密可适用本授权书。 ☐

不保密,本学位论文属于不保密。 ☒

(请在方框内打“√”)

学位论文作者亲笔签名: 钱新杰 日期: 2022 年 6 月 20 日

指导教师亲笔签名: 张锦华 日期: 2022 年 6 月 20 日

目 录

摘 要	I
Abstract	III
缩略词	V
第一章 文献综述	1
1.1 非洲猪瘟病毒概述	1
1.1.1 非洲猪瘟病毒的形态与结构	1
1.1.2 非洲猪瘟病毒的理化性质	1
1.1.3 非洲猪瘟病毒编码的主要蛋白与功能	1
1.2 非洲猪瘟的流行病学	3
1.2.1 非洲猪瘟的传播与流行	3
1.2.2 非洲猪瘟的传播途径与临床症状	4
1.3 非洲猪瘟疫苗的研究进展	4
1.3.1 减毒活疫苗	4
1.3.2 亚单位疫苗	5
1.3.3 病毒活载体疫苗	6
1.3.4 DNA 疫苗	6
1.4 非洲猪瘟的检测与诊断	6
1.4.1 分子生物学检测方法	6
1.4.2 血清学检测方法	7
1.5 单克隆抗体制备技术	8
1.6 研究目的与意义	8
第二章 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白的表达及单克隆抗体的制备	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 质粒、菌株、细胞与实验动物	10
2.1.2 主要试剂	10
2.1.3 主要溶液配制	11
2.1.4 主要仪器	11
2.2 实验方法	12

2.2.1 原核表达载体、真核表达载体的构建与鉴定	12
2.2.2 原核重组蛋白的表达与鉴定	14
2.2.3 原核重组蛋白的大量制备与纯化	14
2.2.4 动物免疫	14
2.2.5 细胞融合	15
2.2.6 阳性杂交瘤细胞的筛选	15
2.2.7 杂交瘤细胞的亚克隆	16
2.2.8 单克隆抗体的反应原性检测	16
2.2.9 单克隆抗体的效价测定	17
2.2.10 单克隆抗体的亚类鉴定	17
2.2.11 单克隆抗体的纯化	17
2.3 实验结果与分析	17
2.3.1 重组质粒的双酶切鉴定	17
2.3.2 重组真核表达质粒的 WB 鉴定	18
2.3.3 重组原核蛋白的表达与纯化鉴定	18
2.3.4 免疫小鼠血清的验证与效价测定	19
2.3.5 单克隆抗体的 Western blot 鉴定	20
2.3.6 单克隆抗体的间接免疫荧光检测	21
2.3.7 单克隆抗体的效价测定及亚类鉴定	21
2.3.8 单克隆抗体的纯化鉴定	21
2.4 讨论	22
第三章 非洲猪瘟病毒双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立	24
3.1 实验材料	24
3.1.1 抗原与抗体	24
3.1.2 主要试剂配制	24
3.1.3 主要仪器	24
3.2 实验方法	24
3.2.1 最佳多抗包被浓度的确定	24
3.2.2 最佳单抗稀释度的确定	25
3.2.3 双抗夹心 ELISA 的灵敏度检测	25

3.2.4 ASFV P72 ELISA 的标准曲线	25
3.2.5 统计学分析	25
3.3 实验结果与分析	25
3.3.1 最佳多抗包被浓度的确定	25
3.3.2 最佳单抗稀释度的确定	26
3.3.3 双抗夹心 ELISA 的灵敏度检测	26
3.3.4 ASFV P72 ELISA 的标准曲线	27
3.4 讨论	27
结 论	30
参考文献	31
致 谢	38

摘要

非洲猪瘟（African Swine Fever, ASF）是由非洲猪瘟病毒（African Swine Fever Virus, ASFV）引起的猪的一种烈性、高度传染性疾病，对养猪业的危害十分严重。2018年8月，非洲猪瘟首次传播进入我国并蔓延全中国，给我国养猪业造成了巨大的经济损失。在非洲猪瘟防控过程中，高效、便捷、敏感的病原检测方法对 ASF 的诊断和防控具有重要意义。目前，针对 ASFV 的荧光定量检测方法已经应用比较广泛，但是，荧光定量方法存在假阳性率高，过度依赖专业的实验室和专业操作人员，无法在养殖场现场进行检测等缺点。针对病毒蛋白的双抗夹心 ELISA 检测方法操作简便快捷，不需要昂贵设备，能够在养殖场现场进行病原的快速检测，对 ASF 的临床诊断和防控意义重大。目前，我国在这方面研究仍然较少，也没有商业化试剂盒面市，存在巨大空白。

非洲猪瘟病毒是一种有囊膜的大型双链 DNA 病毒，编码有 151-200 种病毒蛋白，其中 P72 蛋白是病毒外层衣壳的主要成分，在病毒粒子中含量高，序列保守性好，适用于构建双抗夹心 ELISA 检测方法。本研究利用大肠杆菌原核表达系统表达并且纯化的 P72 蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠，制备了 5 株抗 ASFV P72 蛋白的单克隆抗体；结合本实验室保存的抗 ASFV P72 蛋白的兔多克隆抗体，初步建立了 ASFV 双抗夹心 ELISA 检测方法，并且测试了该检测方法的敏感性。具体研究内容如下：

1. 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白的表达及单克隆抗体的制备

根据 GenBank 上发布的非洲猪瘟病毒 AuhuiXCGQ 株的序列，将合成的 P72 基因构建至原核表达载体 pET-28a 及真核表达载体 pCAGGS-Myc 中，并分别命名为 pET-28a-P72 和 pCAGGS-Myc-P72。在大肠杆菌 BL21 中诱导表达并且纯化重组蛋白 P72。以原核表达的重组 His-P72 蛋白为抗原，免疫 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠。经过三次亚克隆筛选，获得了 5 株抗 P72 蛋白的单克隆抗体，分别命名为 2C4B8、2C4C8、5C11D12、5C11F11 及 7D10C9。Western blot 与 IFA 实验证实制备的单克隆抗体与真核表达的 P72 蛋白具有良好的反应性与特异性，为建立双抗夹心 ELISA 检测方法奠定了基础。

2. 非洲猪瘟病毒双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立

以纯化的鼠单克隆抗体为检测抗体、本实验室保存的兔抗 ASFV P72 多克隆抗体作为捕获抗体、以及山羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 为标记抗体，初步建立了检测 ASFV 的双抗体夹心 ELISA 方法。其中以单克隆抗体 2C4C8 与 5C11D12 为检测抗体，对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ；以 7D10C9 为检测抗体，对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。三株单克隆抗体建立的 ELISA 方法对不同浓度的 P72 抗原均表现出较好的线性关系。该方法的建立为 ASFV 检测试剂的研发提供了方法和物质基础。

结论：本研究成功构建了 ASFV P72 基因的原核表达质粒与真核表达质粒，表达

纯化了 P72 原核重组蛋白；成功制备了 5 株抗 P72 蛋白的单克隆抗体，5 株单抗均具有良好的特异性与反应性；初步建立了检测 ASFV 的双抗体夹心 ELISA 方法，验证表明建立的双抗夹心 ELISA 方法具有较好的敏感性。本研究建立的双抗夹心 ELISA 方法为 ASFV 抗原 ELISA 检测试剂盒的研发提供了重要材料，并且打下了实验基础。

关键词：非洲猪瘟病毒；P72 蛋白；单克隆抗体；双抗夹心 ELISA

Abstract

African Swine Fever (ASF) is a severe and highly contagious disease of pigs caused by African Swine Fever Virus (ASFV), which poses huge threaten to pig industry. African Swine Fever (ASF) first spread into China in August 2018, thereafter national-wide spread, causing enormous economic losses to the pig industry. Efficient, convenient and sensitive pathogen detection methods are of great significance for the diagnosis, prevetion and control of ASF. At present, quantitative PCR (qPCR) methods for ASFV have been widely used, but qPCR methods have some shortcomings, such as high false positive rate, excessive dependence on professional laboratory and professional operators, which cannot be detected on the farm site. The double-antibody sandwich ELISA method for antigen detection is simple and quick to operate, does not need expensive equipment, and can be used for rapid detection of pathogens in clinical field, which contributes to clinical diagnosis and prevention of ASF substantially. At present, there are still few researches in this area in China, and no commercial kits available, leaving a huge gap to fill.

African swine cholera virus (ASF) is a large double-stranded DNA virus with capsule, encoding 151-200 viral proteins, among which P72 protein is the main component of the outer capsid of the virus. It is the dominant protein in virion and highly conservative, which is suitable for the construction of double-antibody sandwich ELISA method. In this study, BALB/c mice were immunized with purified P72 protein expressed by Escherichia coli prokaryotic expression system, and 5 monoclonal antibodies against ASFV P72 protein were generated. Combined with rabbit polyclonal antibody against ASFV P72 protein prepared by our laboratory, a sandwich ELISA method was preliminarily established for ASFV dual antibody detection, and the sensitivity of the detection method was tested. The specific research contents are as follows:

1. Expression of African swine Fever virus P72 protein and generation of monoclonal antibody

According to the sequence of AuhuiXCGQ strain of ASFV published in GenBank, the synthesized P72 gene was constructed into prokaryotic expression vector pET-28a and eukaryotic expression vector pCAGGS-Myc, and named pET-28a-P72 and pCAGGS-Myc-P72, respectively. The recombinant protein P72 was induced and purified in Escherichia coli BL21. BALB/c mice aged 6-8 weeks were immunized with prokaryotic recombinant His-P72 protein as antigen. Five monoclonal antibodies against P72 protein were obtained by three subclonal screening, which were named 2C4B8, 2C4C8, 5C11D12, 5C11F11 and 7D10C9. Western blot and IFA experiments confirmed that the prepared

monoclonal antibody had good reactivity and specificity with the eukaryotic expression of P72 protein, which laid a foundation for the establishment of P72 double-antibody sandwich ELISA detection method.

2. Preliminary establishment of double-antibody sandwich ELISA method for detection of African swine fever virus

Using purified mouse monoclonal antibodies as detection antibody, rabbit anti-ASFV P72 polyclonal antibody stored in our laboratory as capture antibody, and goat anti-mouse IgG (IgG-HRP) as labeled antibody, a sandwich double-antibody ELISA method for the detection of ASFV was preliminarily established. When monoclonal antibodies 2C4C8 and 5C11D12 were used to detect the recombinant P72 protein, the lower limit of detection was 0.25 $\mu\text{g/mL}$. When using 7D10C9 as the detection antibody, the lower limit of detection for recombinant P72 protein was 0.05 $\mu\text{g/mL}$. The ELISA method established by the three monoclonal antibodies showed a good linear relationship with different concentrations of P72 antigen. The establishment of P72 double-antibody sandwich ELISA method provides a literature and reagent basis for the development of ASFV antigen detection assay.

Conclusion: The prokaryotic expression plasmid and eukaryotic expression plasmid of ASFV P72 gene were successfully constructed, and the prokaryotic recombinant protein of P72 gene was expressed and purified. Five monoclonal antibodies against P72 protein were successfully prepared, and all the five monoclonal antibodies showed good specificity and reactivity. A double-antibody sandwich ELISA method was established for the detection of ASFV, and the validation showed that the double-antibody sandwich ELISA method had good sensitivity. The double-antibody sandwich ELISA method established in this study provides important material for the development of ASFV antigen ELISA kit and lays the experimental foundation.

Key words: African swine fever virus; P72 protein; Monoclonal antibody; Double antibody sandwich ELISA

缩略词

英文简写	英文全称	中文翻译
ASF	African Swine Fever	非洲猪瘟
ASFV	African Swine Fever Virus	非洲猪瘟病毒
NCLDV	Nucleocytoplasmic large DNA viruses	核质大 DNA 病毒
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qPCR	quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
LAMP	loop mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
DAS-ELISA	Double-antibody sandwich ELISA	双抗体夹心 ELISA
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
OIE	World Organization for Animal Health	世界动物卫生组织
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	细胞培养基
IFA	indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
WB	Western blot	蛋白免疫印迹
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
kb	kilobase	千碱基
kDa	kilodalton	千道尔顿

第一章 文献综述

1.1 非洲猪瘟病毒概述

1.1.1 非洲猪瘟病毒的形态与结构

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)是非洲猪瘟(African swine fever, ASF)的病原体,属于非洲猪瘟病毒科(Asfarviridae)并且是该科唯一的成员,它是一种大型有囊膜的双链DNA病毒。该病毒属于核质大DNA病毒(NCLDV)超家族^[1],NCLDV具有双链DNA基因组,主要复制场所位于受感染细胞的细胞质^[2]。ASFV病毒粒子的结构比较特殊,和痘病毒,虹彩病毒有一定的类似性,并且基因组的结构和目前已知的其他病毒都不相同^[3]。ASFV的形态呈二十面体,直径为200nm,由包膜、衣壳、内囊膜、核壳和内核组成。病毒基因组是一个线性双链DNA分子,具有共价闭合末端,长度为170-190kb^[4-7],编码151到200个开放阅读框(Open reading frame, ORF)。ASFV的复制周期主要位于细胞质,但细胞核也是早期病毒DNA合成的场所^[8,9]。ASFV除了编码一些专门用于病毒组装的结构蛋白,还编码许多参与逃避宿主防御和DNA复制修复以及基因表达调控的蛋白质^[10]。虽然目前已知一部分ASFV蛋白的功能,但近一半的ASFV基因的功能仍完全未知^[11],需要进一步的探索。

1.1.2 非洲猪瘟病毒的理化性质

非洲猪瘟病毒对低温耐受性较强而对高温耐受性不是很强,经60℃加热20 min或55℃加热30 min可使非洲猪瘟病毒灭活^[12],在密闭容器中以最低70℃维持30 min可使生肉中的ASFV灭活^[13]。一些常见的消毒剂也能杀灭ASFV病毒,戊二醛能够在常温下有效灭活猪心脏组织中的ASFV^[14]、5 mg/L的臭氧水能够有效的杀灭ASFV^[15],1%的邻苯酚能在最短1 h有效灭活ASFV^[18]。2%的NaOH也能够在24 h内杀灭血液中的ASFV^[16],因此养猪场常使用3%的NaOH溶液对畜舍进行喷洒消毒^[17]。

1.1.3 非洲猪瘟病毒编码的主要蛋白与功能

非洲猪瘟病毒编码有151-200种蛋白质,其中有约54种是结构蛋白^[19],这些蛋白在病毒复制及逃避宿主免疫反应方面具有重要功能。其编码的部分蛋白如图1-1所示^[3]。

P72蛋白: P72蛋白由B646L基因编码,相对分子量为73.2 kDa,是ASFV的主要结构蛋白之一,也是一种关键的抗原蛋白。P72蛋白在病毒感染的晚期表达,具有高度抗原性和免疫原性^[20],是病毒外层正二十面体衣壳的主要成分,对病毒衣壳的形成具有重要的作用^[21],同时P72蛋白还是ASFV病毒粒子中含量最高的蛋白。有研究表明表位P72在ASFV入侵中具有构象依赖性,并且其表达是病毒复制的指标^[22, 23]。有学者在杆状病毒系统中表达了P72蛋白和一些其它的病毒蛋白,以此构建了重组疫苗,对猪群进行免疫的结果表明虽然P72抗体能够防止病毒与巨噬细胞的结合,但产生的抗体不能在抗体介导的免疫保护中起到决定性的作用^[20]。基于反向遗传学,陈等

构建了表达 ASFV P72 的重组新城疫病毒 rNDV/P72, 并在小鼠模型中评估了其体液和细胞免疫原性, 结果表明小鼠产生了高水平的针对 P72 的特异性 IgG 抗体^[24]。有学者分析了多米尼加共和国和乌干达的两种不同的 ASFV 毒株的 P72 编码基因的序列, 结果表明其不同地区分离的毒株中高度保守^[25], 这些结果表明 P72 可以作为开发血清学诊断工具的良好候选抗原。目前 IDVet 公司开发了基于 P72 蛋白的双抗夹心 ELISA 检测方法; 多家国内外公司开发了基于 B646L 基因检测 ASFV 的检测方法, 例如线性后指数 PCR (LATE-PCR)、PCR 和实时荧光定量 PCR (qPCR) ^[26,27,28]。

P54 蛋白与 P30 蛋白: P54 和 P30 蛋白在病毒感染过程中的作用相似, 都是参与病毒入侵的结构蛋白, 但它们的作用也存在本质上的不同。P54 蛋白是 ASFV 的一种非常重要的抗原结构蛋白, 由基因 E183L 编码, 相对分子量为 25 kDa^[29]。根据多项研究, 它在病毒形态和病毒感染中起着至关重要的作用, 研究人员发现抗 P54 抗体可防止 ASFV 附着在易感细胞上, 这意味着它在病毒入侵中发挥着一定的作用^[30]。P54 蛋白定位在病毒粒子的脂质外膜上, 也可以通过免疫电镜在被感染细胞的复制工厂中找到^[29]。研究人员生产了一种具有感染性的重组 ASFV 来实时跟踪病毒在受感染细胞中的运动行为, 捕捉 ASFV 在细胞内运动的轨迹和速度使 ASFV 的动态可视化, 发现 P54 可与微管马达蛋白复合体发生相互作用, 使 P54 的表观分子量发生变化^[31]。有学者使用核磁共振 (NMR) 光谱方法发现, 最小的动力蛋白轻链 DYNLL1 可与突触后支架蛋白 gephyrin 以及结构蛋白 P54 产生直接相互作用, 其结果表明 P54 和 gephyrin 是 DYNLL1 的两个靶标, 这些蛋白质的序列都包含 GIQVD 和 KXTQT 基序, 并且谷氨酰胺在其结合中发挥着重要作用^[32,33]。P54 对于将包膜前体募集到组装位点至关重要^[34], ASFV 的血清学诊断中常用到基于杆状病毒和大肠杆菌表达系统中表达的 P54 蛋白^[32,35]。有学者发现 P54 蛋白的抗体抑制了与病毒附着相关的病毒感染周期的第一步, 并通过 P54 在 Vero 细胞中的瞬时表达实验, 证实了 P54 可以在 ASFV 感染早期激活 caspase-3 的凋亡, 这是首次报道 ASFV 蛋白能够诱导细胞凋亡^[36,37]。

P30 蛋白由 CP204L 基因编码, 与 P54 蛋白同样也是在病毒感染早期表达的蛋白, 相对分子量为 30 kDa, 是参与 ASFV 入侵的最具抗原性的结构蛋白之一^[38]。早在病毒感染后约 2 至 4 小时便可在巨噬细胞中发现 P30 的存在, 随后该蛋白可在整个 ASFV 感染周期中持续表达^[23]。有学者通过酵母双杂交系统来筛选猪巨噬细胞 cDNA 文库中可能与 P30 蛋白相互作用的细胞蛋白, 发现异质核糖核蛋白 K (hnRNP-K) 是 P30 蛋白的第一个细胞配体^[39]。研究人员基于嵌合蛋白 P54/30 可以保留完整的抗原决定簇的特点, 构建了重组杆状病毒, 通过在昆虫细胞和粉纹夜蛾中的表达, 发现嵌合蛋白 P54/30 与 ASFV 隐性感染猪的血清可以产生强烈的反应^[40]。Oviedo 等人发现重组 P30 蛋白比 P54 蛋白在 ELISA 检测抗体方面效果更好, 因此 P30 更适合作为 ELISA 抗原, 而 P54 适合作为检测 ASFV 抗体的指定抗原, 但联合使用 P54 和 P30 蛋白进行 ASFV 的血清学诊断可以提高该方法的敏感性^[41]。Giménez 等人开发了一种采用重组 P30 的双基质间接 ELISA, 可灵活检测血清和口腔液样本中的 ASFV 抗体^[42]。有研究表明编码 P54 和 P30 的 DNA 融合疫苗在小鼠中诱导了良好的抗体反应^[43]。然

而，对 P54 和 P30 的中和抗体反应不足以对猪产生抗体介导的保护作用^[20,40]。Argilaguet 等人发现通过将 ASFV 血凝素（sHA）的细胞外结构域添加到 P54 和 P30 可以成倍地提高猪的 DNA 免疫，并且构建的 DNA 疫苗 pCMV-sHAPQ 在免疫后可以诱导强烈的体液和细胞反应^[44]。

CD2V 蛋白：CD2V 蛋白也称为 PEP402R，由 EP402R 基因编码，类似于 T 淋巴细胞表面粘附受体 CD2，相对分子量为 105 kDa^[45]。CD2V 蛋白是一种糖基化蛋白，在病毒发病机制^[46]、宿主定向^[47]和免疫逃逸^[48]中起重要作用。CD2V 蛋白是 ASFV 重要的保护性抗原，可为其提供血清型特异性交叉保护免疫^[49]。对猪免疫 ASFV CD2V 蛋白可以产生针对 M-II 的抗体，并在用同源病毒株感染期间可以起到部分保护作用^[50,51]。研究人员发现，从 ASFV BA71V 株中删除 EP402R 基因不会影响其在 Vero 细胞中的生长^[52]。Frączyk 等人首先报告了与逃避宿主免疫系统有关的基因内的遗传变异性，他们发现 EP402R 基因中存在微小但显著的遗传多样性，并证明了流行的 ASFV 分离株的缓慢分子进化^[52]。有学者对 1978 年至 2014 年收集的 ASFV 毒株的 EP402R 基因进行比较表明，撒丁岛的病毒株可分为两个亚群。一组包括 1978 年至 1990 年的历史分离株，第二组包含 1990 年至 2014 年回收的病毒^[50]。研究发现，一支低毒力的天然非血液吸附（非 HAD）分离株 ASFV/NH/P68 的基因组中 EP402R 和 EP153R 基因被破坏^[53]，然而当完整的 EP153R 基因恢复时，两个重组病毒的滴度比非 HAD 分离株高约 1000 倍，虽然恢复后并没有增加病毒的毒力，但在许多猪身上观察到了病毒血症的症状，这些结果表明 CD2V 蛋白在蜱病毒复制中具有新的作用^[49]。

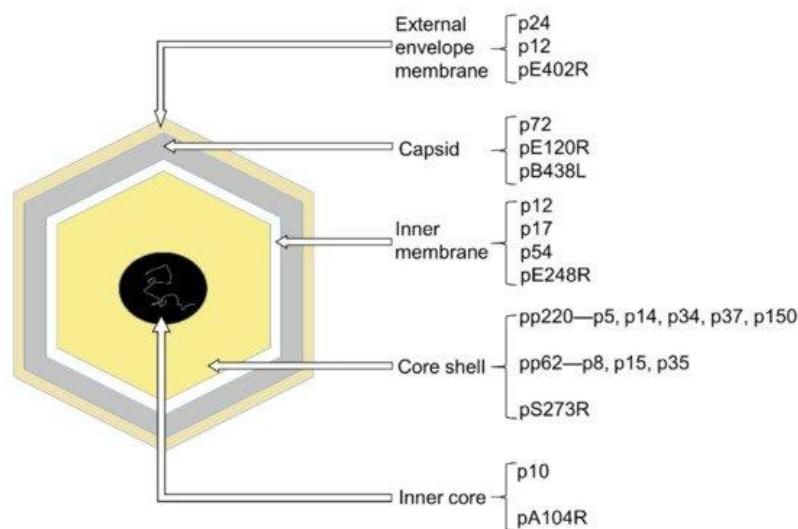


图 1-1 非洲猪瘟病毒编码的主要结构蛋白^[3]

Fig.1-1 Major structural proteins encoded by African swine fever virus^[3]

1.2 非洲猪瘟的流行病学

1.2.1 非洲猪瘟的传播与流行

1921 年，Montgomery 在肯尼亚首次发现了非洲猪瘟^[54]，随后，非洲猪瘟在世界

传播开来。直到 2007 年 6 月,它一直在撒哈拉以南 17 个国家和地区传播^[55]。欧洲于 1957 年首次报道非洲猪瘟,当时该病毒可能与受感染的猪饲料一起从安哥拉传播到葡萄牙^[56]。从 1960 年开始,病毒迅速传播到整个伊比利亚半岛并在该地区停留了 30 多年^[56]。2007 年,非洲猪瘟病毒通过从非洲到波蒂港的一艘运输有受非洲猪瘟污染的屠宰场废物的船上从非洲转移到格鲁吉亚^[57],格鲁吉亚在 2007 年 6 月确认了首例非洲猪瘟病例。由于诊断不及时,非洲猪瘟不仅在该国境内,而且还向其他地区蔓延。到 2007 年底,阿布哈兹、亚美尼亚、车臣、南奥塞梯和俄罗斯联邦记录了非洲猪瘟进一步的暴发^[58,59]。随后几年,该病毒进入欧盟境内,并在 2012-2014 年到达乌克兰、拉脱维亚和波兰。2020 年 1 月至 2021 年 3 月,非洲猪瘟在欧洲(塞尔维亚、拉脱维亚、俄罗斯、匈牙利、摩尔多瓦、罗马尼亚、乌克兰、比利时、斯洛伐克、波兰、希腊、和德国)、亚洲(韩国、中国、越南、缅甸、东帝汶、菲律宾、老挝、印度和印度尼西亚)和非洲(南非、科特迪瓦、尼日利亚、赞比亚和坦桑尼亚)出现^[60]。2021 年 7 月,该疾病在几乎消失 40 年后再次出现在美洲,又先后被引入多米尼加共和国和海地,2022 年 1 月,在意大利发现了 ASFV 基因 II 型^[60]。

1.2.2 非洲猪瘟的传播途径与临床症状

非洲猪瘟的潜伏期从 4 天到约 3 周不等,时间的长短取决于病毒的毒力、宿主相关因素、病毒载量和感染途径^[61]。猪是 ASFV 的唯一天然宿主^[62],除家猪外,野猪、疣猪和寄生于它们的蜱都是病毒的携带者^[63]。有人记录了在马达加斯加无人居住的养猪场中,ASFV 在蜱虫上存在了至少四年的情况^[64]。非洲猪瘟能够通过多种途径进行传播,直接传播和间接传播是其传播的主要方式^[62]。ASFV 可直接通过被感染的动物或生肉及被感染的蜱传播,也可通过病毒污染物间接传播^[65]。非洲猪瘟的临床症状可能与其它一些临床常见的出血性疾病症状相似,如急性弓形虫病、经典猪瘟和猪丹毒等。根据非洲猪瘟的临床表现,可以将其分为四种类型:最急性型、急性型、亚急性型和慢性型。在由高毒力 ASFV 毒株诱导的最急性型中,在感染 4-10 天后,猪死亡率可高达 100%^[66];急性型猪不会立即死亡,可出现高热、食欲减退以及食欲减退的症状^[67];亚急性型与急性型症状类似,症状表现相对于急性型较轻,病死率较低,发病经过变长,病猪可出现无明显规律的体温波动^[68],慢性型的组织学特征为纤维素性心包炎、关节炎、肺炎、胸膜炎和淋巴组织增生肥大等症状^[69]。

1.3 非洲猪瘟疫苗的研究进展

1.3.1 减毒活疫苗

减毒活疫苗是经过减毒处理后仍然具有抗原性的病原体,在宿主体内可诱发全面、稳定、持久的体液、细胞和粘膜免疫应答,相当于自然发生的隐性感染。减毒处理的方式可分为两种,一种是人工诱变,一种是自然界筛选。目前最为流行的减毒处理方式是采用分子生物学中的基因敲除技术将病原体毒力或毒力相关基因片段进行敲除从而降低或消除病原体的毒力作用的人工诱变方法。通过该方法可制备出无潜在风险和回复突变的新减毒活疫苗。

由于 ASFV 的天然弱毒株或传代致弱毒株存在生物安全隐患、免疫副反应、散毒危险及遗传背景不清等诸多缺陷,导致其在实际生产应用中出现很多问题。如伊比利亚半岛在使用研发的一种弱毒疫苗株后,于 1960~1995 年爆发了慢性的 ASF 疫情,因此该 ASFV 弱毒疫苗被认为极有可能是该疫情爆发的根源^[70]。但即便如此,研发 ASFV 的弱毒疫苗依旧是科研人员在开发 ASFV 疫苗的热点,尤其是研发基因工程减毒活疫苗^[71]。Afonso 等^[72]曾发现 ASFV 中的一个高度保守基因 NL,并构建了缺失 NL 基因的欧洲致病毒株突变株用于感染家猪,结果发现该病毒株对家猪完全致弱。但构建的两株 NL 缺失的非洲高毒力致病株突变株感染家猪后仍保留毒力,且该毒力的保留与 NL 基因缺失不相关。因此他们认为 ASFV 强毒株的毒力作用不需要 NL 的功能,单独缺失 NL 基因的 ASFV 不足以构建弱毒疫苗。9GL 也是 ASFV 高度保守基因序列之一,且有体外试验表明,9GL 基因编码的蛋白影响病毒在巨噬细胞培养物中的成熟和增殖^[73]。ASFV 的 9GL 基因与 ASFV 在宿主体内的生长密切相关,所以缺失 9GL 基因的 ASFV 毒株对家猪高度致弱^[74]。将敲除 9GL 基因的 ASFV 病毒作为弱毒疫苗对家猪进行免疫,再用 ASFV 野毒株感染免疫后的家猪发现该疫苗可对家猪产生完全保护。说明缺失 9GL 基因的 ASFV 毒株极可能成为预防 ASF 的有效疫苗。此外, A238L 可对调控促炎细胞因子合成的 NF- κ B 和 NFAT 途径的活化产生抑制作用,有助于病毒逃逸宿主的免疫应答,是 ASFV 的一种免疫调节蛋白^[75]。但将缺失 A238L 基因的毒株感染家猪后其体内的 TNF- α 会升高。因此,仍需要对病毒的免疫调控蛋白对宿主免疫应答进行进一步的研究。

1.3.2 亚单位疫苗

亚单位疫苗是指能够诱发机体产生抗体的微生物的某种表面结构成分,如细菌、病毒的特殊毒素、多糖或蛋白质组分等。目前已知 ASFV 编码的蛋白超过 160 多种,且有多种蛋白的功能及结构被报道,这为研制 ASFV 亚单位疫苗提供了良好的基础。因此已有报道针对 ASFV 的数种蛋白制成重组蛋白疫苗,并对其免疫效果进行了研究。P30、P54、P72 和 CD2V 为目前研究 ASFV 亚单位疫苗的几个热点蛋白。P30 和 P54 作为抗原进行免疫后均能产生中和抗体,但单独对机体进行免疫时无法抵御致死性攻毒,且改变不了病程。由于 P30 和 P54 在 ASFV 感染过程中的作用相似,通常将它们作为联合疫苗进行免疫,且该联合疫苗既可以使机体产生中和抗体,又可以改善病程^[76]。Ivanov 等^[77]对病毒蛋白的 46 种肽进行了模拟评估,从而了解这些蛋白建立保护免疫应答的能力。目前发现联合接种某些肽可起到延缓家猪死亡的作用,但对疣猪的免疫作用仍需要进一步的观察。利用杆状病毒载体表达 ASFV 血凝素作为疫苗免疫猪,攻毒后猪全部存活^[78]。P72 具有高度的抗原性和免疫原性且该基因高度保守,尽管 P72 蛋白免疫动物后能够产生大量中和抗体,但无法提供免疫保护。CD2V 作为 ASFV 唯一的糖蛋白,其作用与 T 淋巴细胞表面黏附受体 CD2 类似。据报道可知 CD2V 使用重组 CD2V 蛋白免疫猪只,再用强毒 E75 株感染猪只,免疫保护效率高达 100%。尽管 ASFV 有很多蛋白成分可作为亚单位疫苗研制的靶蛋白,但较少的细胞免疫保护

以及保护效率方面数据的缺乏使得其疫苗的研发难以进行。因此需要对相关的 ASFV 保护性抗原与现有病毒株多样性之间的关系做更加深入的探索。

1.3.3 病毒活载体疫苗

病毒活载体疫苗是利用基因工程技术, 将外源目的基因导入病毒载体的活疫苗, 该疫苗进入机体后可以通过表达的目的蛋白刺激机体, 产生特异的免疫反应, 从而达到预防某种疾病发生的目的。在抗 ASFV 感染中, 体液免疫产生的抗体发挥着重要的作用, 但细胞免疫如细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 在建立完全保护方面也是不可或缺的, 甚至是完成免疫保护的关键^[79]。有学者通过将编码 ASFV 保护性抗原的基因导入腺病毒或痘病毒载体, 期望制备成的疫苗能够激发机体的细胞免疫和 CTL 反应^[80,81]。Lokhandwala 等首次运用鸡尾酒式免疫^[82], 即分别构建 ASFV 的 P32、P54、pp62 和 P72 基因的腺病毒载体, 再分别用两种不同的佐剂和 2 种剂量 (10^{10} 和 10^{11}) 对猪免疫所表达的 ASFV (Ad-ASFV) 多抗原混合物, 结果很快诱导产生了针对这些抗原的特异性抗体和 CTL 应答。Lokhandwala 又将 ASFV 的 7 种不同功能或免疫特性的新型抗原基因插入腺病毒, 对商品猪进行免疫后大部分都产生了强烈的 ASFV 抗原特异性 IgG 反应^[82]。当然, 所选多抗疫苗是否能够对 ASFV 病毒感染的猪产生保护力还需要进一步的探究。

1.3.4 DNA 疫苗

通过 ASFV 的抗原决定簇可以设计制备 DNA 疫苗, 以达到理想的疫苗应有的诱导机体产生中和抗体与特异性免疫应答的效果。然而, Argilaguet 等^[44]构建了编码 AFSV 两个基因的 DNA 疫苗免疫猪, 却未能引起免疫应答, 在此基础上免疫融合了猪白细胞抗原 2 的基因片段之后, 则检测到猪只的免疫应答呈指数提高, 但当攻毒量达到了致死量, 则不能对猪只进行保护。同组研究者将编码 ASFV 的 HA、P30 和 P54 基因插入真核表达载体, 构建 DNA 疫苗免疫家猪后产生的体液免疫与细胞免疫不能提供保护, 但将泛素化基因与 P30 和 P54 免疫猪, 可诱导猪 CD8+T 细胞强力活化, 结果可提供部分保护, 这表明 DNA 疫苗可通过修饰抗原增强保护力^[83]。另外, 同研究者将 ASFV 重组蛋白与制备的 ASFV DNA 疫苗联合免疫猪, 结果发现可诱导中和抗体和刺激 IFN- γ 产生, 但对 ASFV 强毒株没有保护作用^[44]。

1.4 非洲猪瘟的检测与诊断

非洲猪瘟在临床上不易于其它相似的出血性疾病鉴别, 因此必须依靠实验室检测来诊断该病。实验室诊断主要以分子生物学检测与血清学检测为主。

1.4.1 分子生物学检测方法

PCR 检测: PCR 检测技术是实验室检测 ASFV 最常用的检测技术之一, 全称为聚合酶链式反应, 由变性、退火、延伸三个基本步骤构成, 具有很高的特异性。PCR 可检测血液、血清和组织样品中的 ASFV 基因组, 在其感染早期便可检测出 ASFV。PCR 可检测出各种存在形式的 ASFV, 不仅能够检测出宿主样品中的病毒, 也能对携带 ASFV 的昆虫或 ASFV 的污染物进行检验, 具有很高的敏感性^[84,85]。李艳等根据

ASFV P72 蛋白基因序列设计特异性引物,建立了 ASFV 锁核酸修饰引物 PCR 检测方法。该方法具有良好的敏感性和特异性,其灵敏度可达 3×10^1 copies/ μL ,是常规 PCR 的方法的 100 倍,比 qPCR 方法提高了 10 倍。使用该方法对 72 份临床样品进行检测,其结果与 OIE 推荐的 qPCR 方法检测结果一致,符合率为 100%^[86]。

荧光定量 PCR 检测 (qPCR): qPCR 由普通 PCR 技术发展而来,在其基础上引入了光谱技术,可通过对荧光信号的强弱变化来实时监控 PCR 反应的过程。相比于普通 PCR, qPCR 方法灵敏度高、方便快捷且不易交叉污染,并且根据其结果可定量分析样品中病毒的含量^[87]。King 等首次根据 ASFV 的 VP72 基因设计特异性引物和探针,建立了一种快速检测 ASFV DNA 的 Taq Man qPCR,灵敏度在 10~100 个分子之间,使用该方法对不同地区 25 株代表 9 个基因型 (I、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X) 的 ASFV 分离株和 16 个非洲、欧洲蜚分离株进行验证,结果没有发现与相关的猪病毒发生交叉反应^[88]。

环介导等温扩增检测 (LAMP): LAMP 技术是在恒温条件下,在特异性引物和酶等物质的作用下对核酸进行体外扩增。该法操作简单,不需要特殊的实验设备,可在短时间内完成检测,其结果可肉眼观察,适合在基层兽医实验室与养殖场使用^[89]。Wang 等设计了针对 ASFV P10 基因的 LAMP 引物,并用 PRV、PCV2、CSFV、PRRSV、PPV 和 ASFV 的 DNA 或 cDNA 验证实时 LAMP 和可视化检测的特异性,证实 LAMP 可以准确和特异性检测 ASFV^[90]。

1.4.2 血清学检测方法

酶联免疫吸附实验 (ELISA): ELISA 是 OIE 指定的非洲猪瘟首选血清学检测方法。ELISA 检测方法方便快捷,敏感性好,特异性强,可在短时间内检测大量样品。Vidal 等基于抗 VP73 单克隆抗体建立了一种用单克隆抗体检测猪样品中 ASFV 蛋白的改良固相 ELISA,检测到 VP73 的最低抗原质量浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,低于普通 ELISA 试验检测最极限 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[91]。郭晶等建立了以重组多表位融合蛋白 REME-P72 为包被抗原,抗原包被浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,一抗、二抗稀释倍数分别为 1:200、1:5000 的 ASFV 间接 ELISA 检测方法,呈现出了良好的特异性和敏感性^[92]。

胶体金免疫试纸条:胶体金免疫试纸检测检测技术是将胶体金标记的抗原或抗体作为示踪标记物固定于硝酸纤维素膜上,将试纸条插入检测样品,通过抗原与抗体的反应使胶体金聚集,显示出特定的条带^[93]。吴海涛等制备的以 ASFV P72 多克隆抗体和葡萄球菌蛋白 A (SPA) 作为检测线和质控线的 ASFV 胶体金免疫试纸条,可在 10 min 内就可以检测出阳性抗原,并且具有良好的敏感性和特异性及高度稳定性,在 ASFV 临床检测中有良好的应用前景^[93]。林彦星等制备的快速检测 ASFV 抗体的量子点免疫层析试纸条,其实验结果表明与进口 ELISA 试剂盒对临床样品的检测符合率为 100%^[94]。

双抗体夹心 ELISA:双抗体夹心 ELISA 类似于普通 ELISA,是将特异性的抗体作为固相包被于 96 孔板,作为捕获抗体,加入待测样品与酶标抗体 (检测抗体) 使其显色,对样品抗原进行定性或定量检测的方法。目前已有西班牙 INGEASA 公司和

IDVet 公司的 ASFV 抗原检测 ELISA 试剂盒 (DAS-ELISA) [87], 但国内尚无商品化的 ASFV 双抗夹心 ELISA 试剂盒。Gallardo 等使用此试剂盒对 277 份临床样本进行检测并与 qPCR 相比较, 检测的敏感性为 77.2% [95]。张丽等建立的基于 P54 蛋白单克隆抗体的 ASFV 抗原 DAS-ELISA 检测方法, 与 INGEASA 公司的 DAS-ELISA 试剂盒检测结果符合率为 92% (134/146) [67]。该法操作简便快速且成本较低, 相较于抗体检测可以更早地检出 ASFV, 适合 ASFV 的高通量检测与早期筛查, 在猪场适合使用此方法进行检测。但是与现在比较成熟的荧光定量 PCR 检测方法相比, 双抗夹心 ELISA 检测方法的准确度和特异性稍差。因此, 开发出灵敏度高、特异性强的 ASFV 双抗夹心 ELISA 检测方法对于非洲猪瘟的防控十分有帮助。

1.5 单克隆抗体制备技术

单克隆抗体技术源自上世纪 70 年代, 英国科学家 Milstein 和 Kohler 在 1975 年发明了单克隆抗体并因此在 1984 年获得了诺贝尔医学奖 [96]。其原理是 B 淋巴细胞能够产生抗体, 却不能在体外进行无限分裂, 而瘤细胞虽然可以在体外进行无限传代, 却不能够产生抗体, 将这两种细胞融合, 所得到的杂交瘤细胞则同时具有两种亲本细胞的特性, 科学家基于此发现成功制备了单克隆抗体。单克隆抗体发展至今已 40 多年, 经过了四个发展阶段: 鼠源性单抗 (McAb)、人鼠嵌合性单抗 (Chimeric Antibody)、人源化单抗 (Humanized Antibody) 及全人源单抗 (Fully Human Monoclonal Antibody), 现已被广泛应用于基础研究、医疗诊断和生物制药等方面。单抗药物具有特异性高、性质均一、可针对特定靶点定向制备、靶向性强、疗效确切、副作用少、安全性好等诸多优点, 且相对于化学新药前期研发的盲目和困难的缺点, 单抗类药物只需锁定病变细胞的特异性抗原表位, 便可进行下一步的单抗研发, 因此单抗类药物的临床应用非常广泛且前景广大 [97,98]。

1.6 研究目的与意义

非洲猪瘟的防控主要依赖生物安全防控, 而成功的生物安全防控的前提条件就是能够快速准确的发现 ASFV 的存在。因此在非洲猪瘟的防控中 ASFV 抗原检测处于核心地位。ASFV 临床诊断最常用的检测方法是荧光定量 PCR。目前已经有多个商业化 ASFV qPCR 检测试剂盒获得批准在临床使用。总体来说, qPCR 检测方法特异性好、敏感性高, 在 ASFV 临床诊断中发挥了重要的作用。但是 qPCR 检测方法也存在一些缺陷: 1) qPCR 实验非常容易污染, 造成假阳性; 2) 需要具备专业背景的操作人员; 3) qPCR 检测需要高标准的, 严格分区的 PCR 实验室; 4) qPCR 检测需要的时间较长, 一般需要 4-8 小时。这些缺陷导致在养殖场现场很难开展 qPCR 检测。大部分养殖企业对 ASFV 核酸的检测都需要转交给专业的第三方检测实验室完成, 这就大大增加了临床诊断的时间, 这一缺陷对位置偏远的养殖企业尤其致命。

双抗夹心 ELISA 检测方法相较于 qPCR 检测方法有以下几点优势: 1) 检测操作

简便，不需要专业操作人员；2) 不需要昂贵的仪器，也不需要专业的实验室；3) 检测速度快，PCR 检测至少需要 4 小时才能出结果，而双抗夹心 ELISA 只需要 2 个小时就能出结果；4) 结果稳定可靠，不容易出现假阳性；因此，双抗夹心 ELISA 检测方法非常适合用于猪场现场的 ASFV 抗原检测。目前，我国在 ASFV 双抗夹心 ELISA 检测方法方面研究较少，存在巨大的空白。

P72 蛋白在 ASFV 病毒粒子中含量高，序列保守性强，是双抗夹心 ELISA 的理想靶蛋白。本研究利用原核表达的 P72 蛋白作为抗原，制备了 5 株抗 ASFV P72 蛋白的鼠源单克隆抗体，且被证实能够与 P72 蛋白发生特异性反应。基于本实验室保存的抗 P72 蛋白兔多克隆抗体和制备的抗 P72 蛋白鼠单克隆抗体，建立了双抗夹心 ELISA 方法，并对其敏感性进行评估，为后续非洲猪瘟诊断技术的建立奠定了基础。

第二章 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白的表达及单克隆抗体的制备

P72 蛋白是非洲猪瘟病毒一种理想的血清学与免疫学检测抗原,本研究构建了原核表达质粒 pET-28a-P72 及真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72,并将原核表达质粒 pET-28a-P72 转入 BL21 感受态细胞,表达原核重组蛋白并开展重组蛋白的制备。以原核表达的重组 ASFV P72 蛋白为抗原,免疫 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠,制备了 5 株抗 P72 蛋白的单克隆抗体,验证表明制备的单抗具有良好的反应性,为后续建立双抗夹心 ELISA 检测方法奠定了基础。

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、菌株、细胞与实验动物

原核表达载体 pET-28a 与真核表达载体 pCAGGS-Myc 均由本实验室保存,大肠杆菌 Top10、BL21 (DE3) 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。HEK 293T 细胞为本实验室保存;动物免疫所用抗原为本实验室制备的重组 ASFV P72 蛋白;SP2/0 骨髓瘤细胞为本实验室保存;6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

2.1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶及其缓冲液	Takara 公司
DNA Marker	擎科生物公司
DNA 胶回收试剂盒	OMEGA 公司
质粒小提试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen 公司
Myc 标签抗体	博尔迈生物技术有限公司
HRP Goat anti Mouse IgG (H+L)	武汉安特捷生物技术有限公司
蛋白质分子质量标准	索莱宝生物公司
His 标签蛋白纯化试剂盒	上海生工生物工程技术有限公司
ECL 化学发光试剂盒	碧云天生物技术有限公司
弗氏完全佐剂	SIGMA 公司
弗氏不完全佐剂	SIGMA 公司
融合剂 PEG2000	SIGMA 公司
HAT 培养基补充剂 (50×)	SIGMA 公司
HT 培养基补充剂 (50×)	SIGMA 公司
L-Glutamine	SIGMA 公司
DMEM 基础培养基	Gibco 公司

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)	Gibco 公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
TMB 显色液	天根生化科技 (北京) 有限公司
单抗亚类鉴定试剂盒	北京博奥龙免疫技术有限公司
FITC 及 DAPI 荧光染料	Thermo Fisher 公司

2.1.3 主要溶液配制

LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 酵母提取物 5 g, 加入 900 mL ddH₂O, 使用玻璃棒搅拌使充分其溶解, 使用 5 M 的 NaOH 调节 pH 至 7.0-7.4, 然后定容至 1 L, 高压灭菌后储存于 4℃, 备用。

LB 固体培养基: 称取氯化钠 5 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母提取物 2.5 g, 加入 7.5 g (15g/L) 的琼脂粉, 加入 500 mL ddH₂O, 充分溶解后高压灭菌, 待其冷却至约 45℃, 加入终浓度为 50 µg/ml 的抗生素, 摇匀后倒入灭菌平皿, 待其凝固后置于 4℃ 保存备用。

氨苄青霉素溶液 (Amp): 称取氨苄青霉素粉末 1 g 并溶于 20 mL 去离子水中 (50 mg/mL), 再用 0.22 µm 的滤器过滤, 分装保存在 -20℃ 备用, 使用时以 1:1000 稀释。

卡那霉素溶液 (Kan): 称取氨苄青霉素粉末 1 g 并溶于 20 mL 去离子水中 (50 mg/mL), 再用 0.22 µm 的滤器过滤, 分装保存在 -20℃ 备用, 使用时以 1:1000 稀释。

IPTG 溶液: 称取 IPTG 粉末溶于 10 mL 去离子水, 使其终浓度为 1 M, 待其完全溶解后使用 0.22 µm 的滤器过滤, 分装保存在 -20℃ 备用。

Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (1×): 称取 Tris 碱 3.03 g, 甘氨酸 14.4 g, SDS 1 g, 用 ddH₂O 定容混匀至 1 L。

转膜缓冲液: 称取 Tris 碱 2.9 g, 甘氨酸 1.45 g, 用 300 mL ddH₂O 使其充分溶解, 加入 100 mL 无水甲醇, 用 ddH₂O 定容混匀至 500 mL。

考马斯亮蓝染色液: 称取考马斯亮蓝 R-250 粉末 1 g, 95%乙醇 210 mL, 冰醋酸 50 mL, 用 ddH₂O 定容混匀至 500 mL。

PBS 缓冲液: 称取 KH₂PO₄ 0.27 g, Na₂HPO₄ 1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 用 ddH₂O 定容至 1 L, 高压灭菌后置于 4℃ 备用。

2.1.4 主要仪器

台式高速离心机	Thermo Fisher 公司
恒温振荡培养箱	韶关市泰宏医疗器械有限公司
超净工作台	Labconao 仪器有限公司
DK-8D 数显恒温水浴锅	金坛市医疗仪器厂
恒温金属	ThermoFisher 公司
超声波细胞粉碎机	Invitrogen 公司
高压灭菌锅	宁波新芝生物科技有限公司
核酸电泳仪	Bio-Rad 公司
凝胶成像系统	Bio-Rad 公司

蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
ChemiDoc MP System 全能型成像系统	Bio-Rad 公司
超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
倒置荧光显微镜	Carl Zeiss 公司
CO ₂ 培养箱	ThermoFisher 公司
多功能酶标仪	ThermoFisher 公司

2.2 实验方法

2.2.1 原核表达载体、真核表达载体的构建与鉴定

2.2.1.1 ASFV P72 基因的合成

根据 GenBank 发布的 ASFV AuhuiXCGQ 毒株序列 (GenBank 登录号: MK128995.1) 合成了 ASFV P72 全长基因, 并根据载体 pET-28a 与 pCAGGS-Myc 的多克隆位点在合成的基因上插入酶切位点, 其中 5' 端插入 EcoRI (GAATTC) 酶切位点, 3' 端插入 XhoI (GAGCTC) 酶切位点, 便于目的基因与载体的连接, 基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2.2.1.2 目的基因与载体的双酶切

取 pET-28a、pCAGGS-Myc 空载体与合成的含有 ASFV P72 全长基因的质粒各 5 μ g, 酶切体系如下:

质粒	5 μ g
EcoRI	1 μ L
XhoI	1 μ L
10 $\times$ H Buffer	5 μ L

补加 ddH₂O 至 50 μ L, 混匀离心后置于 37 $^{\circ}$ C 金属浴酶切 3 h。酶切产物进行核酸电泳, 使用 OMEGA DNA 胶回收试剂盒回收目的片段。

2.2.1.3 目的基因与载体的连接与转化

将回收的目的片段与切开的载体 pET-28a 和 pCAGGS-Myc 按照摩尔比 3: 1 加至如下连接体系:

P72 基因	5 μ g
载体 (线性)	5 μ g
T4 DNA Ligase	1 μ L
10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer	5 μ L
Total	10 μ L

将配置好的连接体系置于 16 $^{\circ}$ C 恒温金属浴连接 6 h 后, 按照下列步骤将连接产物转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞:

1) 将感受态细胞从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出, 置于冰上融化后, 吸取 30 μ L Top10 感受态细胞至 1.5 mL 离心管中, 使用移液枪将 10 μ L 连接产物全部加入, 并轻轻搅拌均匀,

冰浴 30 min;

2) 转移至 42℃ 水浴锅热应激处理 90 s (时间不宜过久), 之后迅速转移至冰上静置 3-5 min;

3) 静置完成后在超净台中向离心管内加入 1 mL LB 液体培养基 (不加抗生素), 于 37℃ 恒温振荡培养箱以 200 rpm 的转速振荡培养 1 h;

4) 将复苏好的菌液以 4000 rpm 的转速离心 5 min, 弃掉 800 μ L 上清, 将余下菌液重悬混匀后均匀涂布于对应抗性的 LB 固体平板上, 平板于 37℃ 恒温培养箱倒置过夜培养, 待长出单个菌落后挑选 5 个进行鉴定。

2.2.1.4 重组质粒的提取与鉴定

挑选单克隆菌落进行鉴定, 将鉴定正确的阳性菌液送至擎科生物技术有限公司进行测序分析, 测序成功的菌液进行扩大培养, 保留部分菌液与 50% 甘油 1:1 混合后保存于 -80℃ 超低温冰箱备用, 余下菌液使用天根质粒小提试剂盒提取质粒。将提取的质粒进行双酶切鉴定, 酶切体系如下:

质粒	2 μ g
EcoRI	1 μ L
XhoI	1 μ L
10×H Buffer	5 μ L

补加 ddH₂O 至 50 μ L, 混匀离心后置于 37℃ 金属浴酶切 1 h, 酶切产物核酸电泳后进行凝胶成像分析。

2.2.1.5 真核重组质粒 pCAGGS-Myc-P72 的 WB 鉴定

使用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 将酶切鉴定正确的重组质粒 pCAGGS-Myc-P72 转染至 HEK 293T 细胞, 同时转染 pCAGGS-Myc 空载体作为对照, 换液 12 h 后使用 RIPA 全细胞裂解液收集细胞样品于 1.5 mL 离心管中, 加入蛋白上样缓冲液后煮沸 10 min。样品保存于 -80℃ 备用。

按照塞维尔蛋白胶试剂盒说明书配制蛋白胶, 取配制好的蛋白胶, 组装好电泳装置, 加入 SDS-PAGE 电泳缓冲液, 拔掉胶孔梳, 每孔加入 10 μ L 蛋白样品进行蛋白电泳。电泳完成后按照如下操作进行 Western Blot, 一抗为鼠抗的 MYC 标签抗体, 二抗为鼠抗。

1) 转膜: 将蛋白胶小心取出, 依次在转膜夹中放入海绵片、3 层滤纸、蛋白胶、PVDF 膜、3 层滤纸和海绵片, 每层放入时均进行赶气泡操作。设置恒流 200 mA, 在转膜槽外部加水及冰袋进行物理降温。

2) 封闭: 取出 PVDF 膜于 10% 的脱脂奶粉 (PBS 配制) 中, 没过 PVDF 膜, 并于 37℃ 恒温培养箱内孵育 4 h。

3) 洗涤: 取出 PVDF 膜于 1×PBST 中, 洗涤 5 min, 重复三次。

4) 孵育一抗: 取出 PVDF 膜于一抗 (1:2000 稀释) 中, 4℃ 孵育 12 h。

5) 洗涤: 取出 PVDF 膜, 先用清水冲洗表面的抗体, 再放于 1×PBST 溶液中, 洗涤 10 min, 重复三次。

6) 孵育二抗: 取出 PVDF 膜于二抗 (1:5000 稀释) 中, 室温孵育 2 h。

7) 洗涤: 取出 PVDF 膜, 先用清水冲洗表面的抗体, 再放于 $1\times$ PBST 溶液中, 洗涤 10 min, 重复三次。

8) 显色: 取出 PVDF 膜, 沥干清洗液, 平置于显色板上, 勿产生气泡, 滴加 ECL 化学发光液, 拍照并保存。

2.2.2 原核重组蛋白的表达与鉴定

将重组原核表达质粒 pET-28a-P72 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 具体操作同 2.2.1.3, 挑菌鉴定后将所得阳性菌液接种至含对应抗性抗生素 (卡那霉素) 的 LB 液体培养基中扩大培养, 待菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.4-0.6 时, 加入 1 mM 的 IPTG 进行诱导, 收集菌体进行超声破碎, 以未诱导的菌体及诱导的空载体为对照, 煮蛋白样后进行 SDS-PAGE 分析。

2.2.3 原核重组蛋白的大量制备与纯化

1. 重组蛋白的大量表达: 重组蛋白经鉴定后主要以包涵体的形式存在。将分析正确的蛋白样对应的菌液接种于 200 mL LB 液体培养基扩大培养, 待菌液 OD₆₀₀ 值至 0.4-0.6 时加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 于 37℃ 诱导培养 5 h。4000 rpm 离心 10 min 收集菌体, 使用 PBS 洗涤菌体三次, 使用 1/10 体积的 PBS 重悬菌体, 于冰上超声破碎 30 min (至菌体清亮)。12000 rpm 4℃ 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀中加入 20 mL 8M 尿素并剧烈搅动, 于 4℃ 过夜使其缓慢溶解变性, 次日以 12000 rpm 转速, 4℃ 离心 10 min 收集上清溶液并用 0.45 μm 滤器过滤。

2. 重组蛋白的纯化: 重组蛋白 pET-28a-P72 使用上海生工 His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化, 操作如下:

1) 用 5 倍柱体积的 ddH₂O 洗涤层析柱, 然后用 5 倍柱体积的结合 Buffer 进行平衡, 使层析介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用;

2) 将样品加到平衡好的层析介质中, 流速控制在 0.5 mL/分钟左右 (保证目的蛋白与层析介质充分接触, 提高目的蛋白的回收率), 收集流出液;

3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗, 流速控制在 1-1.5 mL/分钟, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液;

4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分;

5) 依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质, 最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡, 然后保存在等体积的 20% 的乙醇中, 置于 4℃ 保存, 防止层析介质被细菌污染。

3. 包涵体蛋白的复性: 将纯化收集的洗脱液装入预处理好的透析袋中, 依次置于 6 M、4 M、2 M、1 M 的尿素缓冲液中透析, 每 6 h 更换透析液, 最后置于 PBS 溶液中透析。吸取少量透析完成的蛋白测定其浓度, 加入蛋白上样缓冲液制成蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析。

2.2.4 动物免疫

挑选 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 以重组 pET-28a-P72 蛋白为抗原, 用等体积

的弗氏完全佐剂与抗原进行乳化，以 200 μg 蛋白每只的抗原量皮下多点注射进行首次免疫，后续免疫使用弗氏不完全佐剂乳化，免疫 4 次，每次免疫间隔 14 d。第 3 次免疫后 7 d 对被免疫小鼠进行颌下采血，对血清进行 IFA 分析并用间接 ELISA 法检测血清效价。细胞融合前第 7 d 加强免疫。

2.2.5 细胞融合

2.2.5.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备

细胞融合前 7 d，取出于液氮保存的 SP2/0 细胞，使用 1640 培养基复苏培养 2-3 代，选取细胞大小均一、细胞轮廓界限清晰，培养液中无杂质的细胞备用。

2.2.5.2 饲养细胞的制备

细胞融合前 1 d，取阴性 BALB/c 小鼠，脱颈处死后将其浸泡于 75%酒精中消毒 5 min，然后转移至无菌操作台操作；将小鼠固定在解剖板上，用提前消毒好的剪刀剪开腹部皮肤，暴露出腹膜，用酒精棉球对腹膜消毒；使用注射器吸取 10 mL HAT 培养基注射至小鼠腹腔，轻轻按压小鼠腹腔，反复抽吸 2-3 次获取巨噬细胞，将吸取的巨噬细胞注入到提前备好的容器中并做细胞计数，稀释后加入到 96 孔板中，饲养细胞置于 37℃ 二氧化碳培养箱培养。

2.2.5.3 免疫脾细胞的制备

取完成免疫的小鼠，眼眶放血处死并收集血液，离心收集上清即为阳性血清，将小鼠浸泡于 75%酒精中 5 min 以消毒；转移至无菌操作台，将小鼠固定在解剖板上，用已消毒好的剪刀剪开皮肤与腹膜，无菌操作摘取脾脏，使用剪刀和镊子轻轻除去表面附着的组织；将脾脏转移至装有少量不完全培养基的无菌平皿中，使用注射器吸取不完全培养基后扎入脾脏，轻轻打入以冲洗出脾淋巴细胞，反复冲洗至脾脏颜色发白，收集冲洗液至离心管，1000 rpm 离心 10 min，弃上清，使用 HAT 培养基重悬细胞，做细胞计数并稀释备用。

2.2.5.4 细胞融合

将提前制备好的 SP2/0 骨髓瘤细胞与脾淋巴细胞按照 1:10 的比例在 50 mL 离心管中混匀，1000 rpm 离心 10 min 收集细胞；弃去上清（可用无菌滤纸吸干，避免残余液体对细胞融合的影响），轻轻敲弹管底使细胞沉淀松散，在 1 min 内向管中加入提前预热至 37℃ 的 50%PEG 1 mL 并用吸管轻轻搅拌混合；加完后将其置于 37℃ 水浴中静置 1 min，然后向管中缓慢加入预热至 37℃ 的 1640 培养基 30 mL，37℃ 静置 10 min 后 1000 rpm 离心 10 min，弃去上清；向离心管中加入适量的 HAT 培养基，将重悬混匀后的细胞加入至培养有饲养细胞的 96 孔板中，每孔 100 μL ；将 96 孔板置于 37℃ 二氧化碳培养箱继续培养；融合 5 d 后弃去原始孔中一半的培养基并补加新鲜的 HAT 培养基，融合 7-10 d 后更换为 HT 培养基，待融合细胞的集落长至培养孔底部的 1/4 时，可吸取细胞培养上清进行抗体检测。

2.2.6 阳性杂交瘤细胞的筛选

使用间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞：

- 1) 抗原包被：将纯化好的重组 P72 蛋白用抗原包被液稀释到浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，

以每孔 100 μL 加入酶标板中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;

2) 封闭: 次日弃掉孔中的包被液并拍干, 加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干后每孔加入 300 μL 封闭液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱封闭 2 h; 弃掉孔中的封闭液并拍干, 加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干后用于下一步;

3) 孵育一抗: 将杂交瘤细胞上清以每孔 100 μL 加入孔中, 同时设置 PBS 为阴性对照, P72 蛋白免疫的小鼠血清为阳性对照, 酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h;

4) 孵育二抗: 弃去一抗, 加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 每孔加入 100 μL 用 PBST 稀释 (1:2000) 的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h;

5) 显色: 弃去二抗, 加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 每孔加入 100 μL TMB 显色底物, 于室温避光静置 15 min;

6) 终止显色: 加入终止液 (2 M H_2SO_4) 50 μL 每孔终止显色;

7) OD 值测定: 将酶标板置于酶标仪读取 OD450 nm 的吸光值, 保存结果以分析, 以 $P/N \geq 2.1$ 作为阳性判定标准。

2.2.7 杂交瘤细胞的亚克隆

采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的亚克隆:

1) 制备饲养细胞悬液, 方法同 2.2.5.2;

2) 制备待克隆的杂交瘤细胞悬液: 选取长势较好, 细胞集落单一的阳性杂交瘤细胞, 用 11 mL 含 20% FBS 的 HT 培养基将原始孔中细胞重悬, 逐步稀释至每毫升含 10 个细胞 (按照 10 倍比稀释, 10^4 - 10^1);

3) 按照每毫升加入 5×10^4 - 1×10^5 个细胞的比例, 在制备的杂交瘤细胞悬液中加入饲养细胞;

4) 将上述细胞悬液以每孔 100 μL 的量分装至 96 孔板, 每块 96 孔板做好标记, 定时观察细胞生长情况;

5) 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱湿润培养 7-10 d, 取杂交瘤细胞上清进行 ELISA 检测, 选取阳性孔再次进行亚克隆, 以相同方法重复进行 3 次获取阳性杂交瘤细胞;

6) 3 次亚克隆后, 挑选出 100%阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养, 建立细胞株并命名, 细胞冻存于液氮中备用。

2.2.8 单克隆抗体的反应原性检测

2.2.8.1 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

将真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 及空载体 pCAGGS-Myc 转染至 HEK 293T 细胞, 以制备的单抗为一抗 (1:5000 稀释), HRP 标记的 Goat anti Mouse IgG (H+L) 为二抗 (1:2000 稀释) 进行 Western blot 分析, 具体操作同 2.2.1.5。

2.2.8.2 单克隆抗体的间接免疫荧光检测

以间接免疫荧光实验 (Indirect immunofluorescence assay, indirect IFA) 检测所制备单抗的特异性与反应原性: 将 HEK 293T 细胞接种至 24 孔细胞培养板, 待细胞长至 80%-90%后, 转染真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72, 同时转染空载体 pCAGGS-Myc

为对照；转染 5 h 后将培养液更换为含 2% FBS 的培养基，继续培养 12 h；弃去培养液，用 PBS 洗涤 3 次；加入 4% 多聚甲醛于 4℃ 过夜固定，PBS 洗涤 3 次；加入无水甲醇透化处理 15 min，PBS 洗涤 3 次；加入封闭液（10% BSA）室温孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次；加入待检的单抗样品（1:5000 稀释），室温孵育 1 h；PBS 洗涤 3 次；加入异硫氰酸荧光素染料（FITC），37℃ 避光孵育 30 min；PBS 洗涤 3 次后，加入 DAPI 染色液，室温避光放置 15 min；PBS 洗涤 3 次后在荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.9 单克隆抗体的效价测定

使用间接 ELISA 法测定所得单抗的效价，以所得杂交瘤细胞上清为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗（1:2000 稀释），阴性对照为 PBS，显色后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值，具体操作同 2.2.6。

2.2.10 单克隆抗体的亚类鉴定

使用博奥龙小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒，按照其说明书对获得的单克隆抗体进行亚类鉴定。

2.2.11 单克隆抗体的纯化

选取 3 株特异性良好，效价水平较高的单克隆抗体（2C4C8、5C11D12、7D10C9），以 1×10^5 个/只的细胞量对小鼠进行腹腔注射，以辛酸-硫酸铵法从腹水中纯化单克隆抗体，收集纯化的抗体测定其浓度并作 SDS-PAGE 鉴定。将真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 及空载体 pCAGGS-Myc 转染至 HEK 293T 细胞，以纯化的单抗为一抗进行 Western blot 分析，具体操作同 2.2.1.5。

2.3 实验结果与分析

2.3.1 重组质粒的双酶切鉴定

将 P72 基因克隆至原核表达载体 pET-28a 及真核表达载体 pCAGGS-Myc，使用 EcoRI、XhoI 对重组质粒进行双酶切鉴定，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳，得到两个预期大小的目的片段（图 2-1），大片段为载体，小片段为 1941 bp 的 P72 基因，且基因测序结果完全正确，表明重组质粒构建成功。

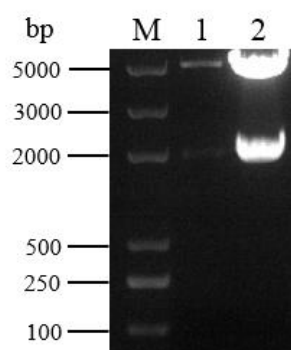


图 2-1 重组质粒的双酶切鉴定

A: M: DL 5000 DNA Marker 1:pET-28a-P72 2: pCAGGS-Myc-P72

Fig.2-1 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid

A: M: DL 5000 DNA Marker 1:pET-28a-P72 2: pCAGGS-Myc-P72

2.3.2 重组真核表达质粒的 WB 鉴定

以 Western Blot 实验验证真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 的真核表达效果。使用转染试剂 Lipofectamine™2000 将酶切鉴定正确的重组质粒 pCAGGS-Myc-P72 转染至 HEK 293T 细胞，同时转染 pCAGGS-Myc 空载体作为对照。以 1:2000 稀释的 Myc 标签抗体为一抗进行 WB。结果如图 2-2 所示，真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 可表达出 73 kDa 特异条带，表明 P72 蛋白成功在 293T 细胞中表达。

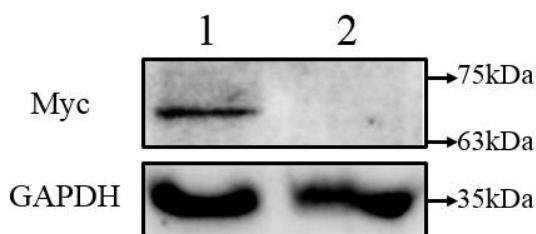


图 2-2 重组质粒 pCAGGS-Myc-P72 的 Western Blot 鉴定

1:pCAGGS-Myc-P72 2: pCAGGS-Myc

Fig.2-2 Western Blot identification of recombinant plasmid pCAGGS-Myc-P72

1:pCAGGS-Myc-P72 2: pCAGGS-Myc

2.3.3 重组原核蛋白的表达与纯化鉴定

将重组质粒 pET-28a-P72 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)，经 1mM 的 IPTG 诱导表达 5 h 后，超声破碎收集菌体，制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析。结果显示，pET-28a-P72 可以表达出大小约为 75.9 kDa 的蛋白，与预期大小一致，重组蛋白以包涵体的形式存在。将成功表达的 P72 重组蛋白用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化后进行 SDS-PAGE 分析，结果显示出约 75.9 kDa 大小的条带，与预期大小一致（图 2-3）。

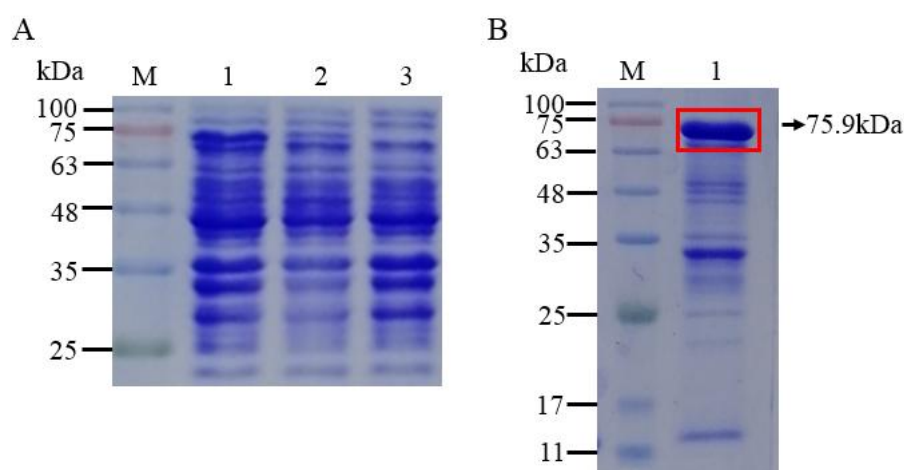


图 2-3 重组蛋白 pET-28a-P72 的原核表达与纯化

A: 1:诱导的 pET-28a-P72; 2: 未诱导的 pET-28a-P72; 3: 诱导的 pET-28a; M: 蛋白分子质量标准

B: M:蛋白分子质量标准; 1:纯化的 pET-28a-P72 重组蛋白

Fig.2-3 Prokaryotic expression and purification of recombinant pET-28a-P72 protein

A: 1: Induced pET-28a-P72; 2: Uninduced pET-28a-P72;

3: Induced pET-28a; M: Protein molecular quality standard;

B: M: Protein molecular quality standard; 1: Purified recombinant pET-28a-P72 protein

2.3.4 免疫小鼠血清的验证与效价测定

2.3.4.1 免疫小鼠血清的 IFA 验证

将真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 及空载体 pCAGGS-Myc 转染至 HEK 293T 细胞，将采集的免疫三次 P72 蛋白的小鼠血清作为一抗（1:5000 稀释）进行间接免疫荧光实验。结果显示，转染 pCAGGS-Myc-P72 的细胞可出现特异性的荧光，而空载体没有（图 2-4），说明 P72 蛋白诱导了特异性的免疫反应，产生的抗体具有良好的敏感性和特异性。

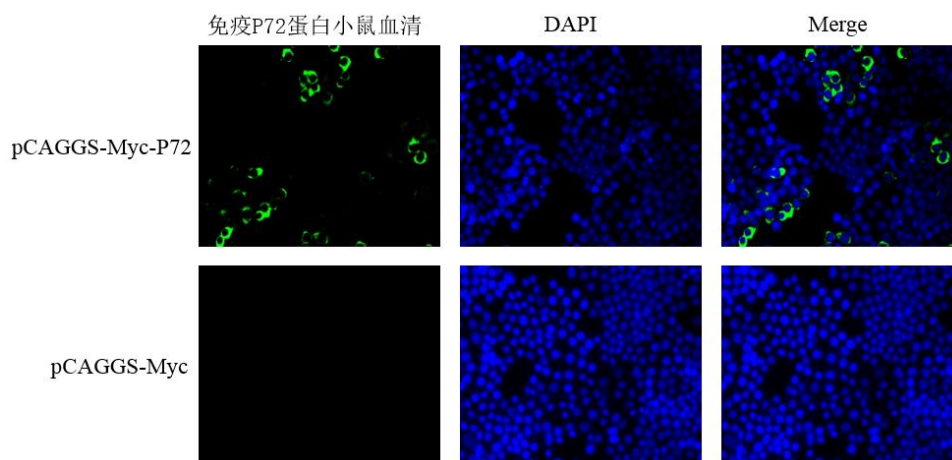


图 2-4 免疫小鼠血清的 IFA 验证

Fig.2-4 IFA validation of serum of immunized mice

2.3.4.2 免疫小鼠血清的效价测定

将三次免疫后的小鼠颌下采血，收集血清作为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗（1:2000 稀释），用间接 ELISA 法测定血清的效价，血清从 1:200 做倍比稀释至 1:25600。结果显示免疫的三只小鼠的血清效价均可达到 1:25600 以上，可用作下一步的细胞融合制备单克隆抗体（图 2-5）。

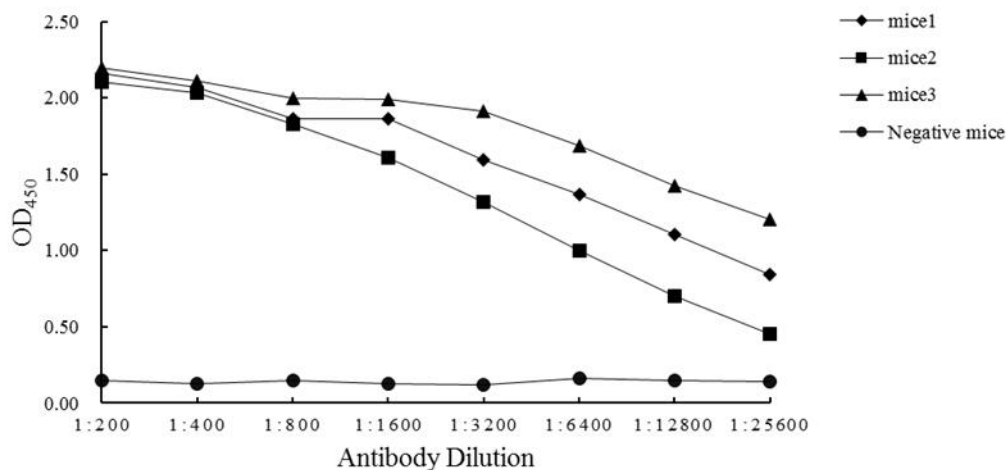


图 2-5 免疫小鼠的血清效价测定

Fig.2-5 Assay of serum titer of immunized mice

2.3.5 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

三次有限稀释后，得到了 5 株单克隆抗体，分别命名为 2C4B8、2C4C8、5C11D12、5C11F11 及 7D10C9。将真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 及空载体 pCAGGS-Myc 转染至 HEK 293T 细胞，以制备的单抗为一抗（1:5000 稀释），HRP 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）为二抗（1:2000 稀释）进行 WB。结果显示，制备的 5 株单抗均能与 P72 蛋白产生特异性反应，出现约 73 kDa 大小的条带，而空载没有条带，表明所制备的单抗具有良好的特异性（图 2-6）。

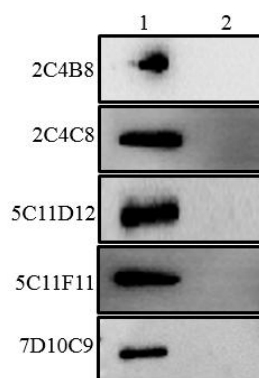


图 2-6 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

1:pCAGGS-Myc-P72 2: pCAGGS-Myc

Fig.2-6 Western blot identification of monoclonal antibodies

1:pCAGGS-Myc-P72 2: pCAGGS-Myc

2.3.6 单克隆抗体的间接免疫荧光检测

将真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72 转染 HEK 293T 细胞，同时转染空载体 pCAGGS-Myc 为对照，以所制备的单克隆抗体为一抗（1:5000 稀释），对获得的 5 株单抗进行 IFA 鉴定。结果表明，5 株单抗均能呈现特异性的荧光，而空载体对照细胞没有观察到任何荧光信号（图 2-7）。

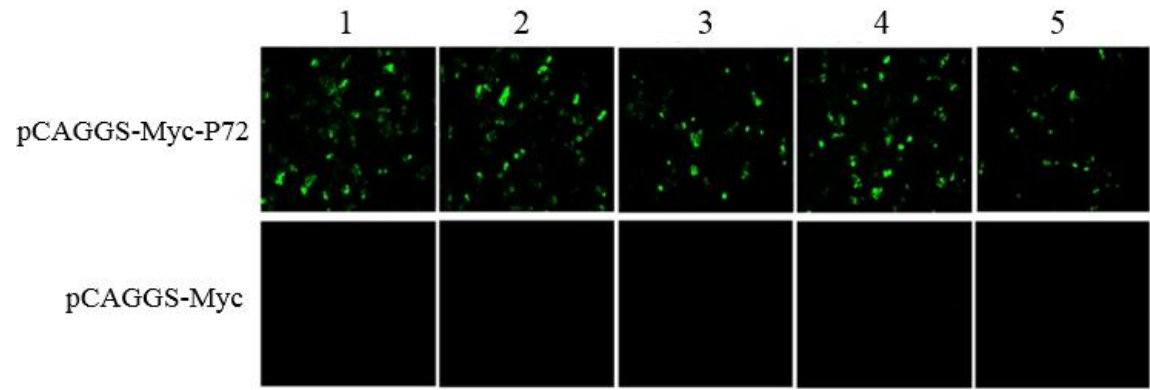


图 2-7 单克隆抗体的间接免疫荧光鉴定

1:2C4B8; 2: 2C4C8; 3: 5C11D12; 4: 5C11F11; 5: 7D10C9

Fig.2-7 Indirect immunofluorescence detection of monoclonal antibodies

1:2C4B8; 2: 2C4C8; 3: 5C11D12; 4: 5C11F11; 5: 7D10C9

2.3.7 单克隆抗体的效价测定及亚类鉴定

以制备 5 株的单克隆抗体为一抗，采用间接 ELISA 法测定其效价。用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对获得的五株单抗进行亚型鉴定，结果如表 3-1 所示，2C4B8 和 2C4C8 属于 IgG₁，5C11D12 和 5C11F11 属于 IgG_{2b}，7D10C9 属于 IgG_{2a}。

表 2-1 单克隆抗体的效价测定与亚类鉴定

MAbs	ELISA Titer	MAb subclass	Light chain
2C4B8	102400	IgG ₁	Kappa
2C4C8	>204800	IgG ₁	Kappa
5C11D12	>204800	IgG _{2b}	Kappa
5C11F11	102400	IgG _{2b}	Kappa
7D10C9	>204800	IgG _{2a}	Kappa

2.3.8 单克隆抗体的纯化鉴定

选取 3 株特异性良好，效价水平较高的单克隆抗体（2C4C8、5C11D12、7D10C9）以辛酸-硫酸铵法从腹水中纯化。纯化后使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度，单抗 2C4C8 浓度为 1.5 mg/mL，单抗 5C11D12 浓度为 2.9 mg/mL，单抗 7D10C9 浓度为 1.5 mg/mL。经 SDS-PAGE 验证，纯化出的 3 株单克隆抗体分别在 55 kDa 和 25 kDa 处有明显的条带，和抗体的重链与轻链的分子量大小吻合（图 2-8）。经 WB 验证表明，纯化的单克隆抗体仍具有良好的反应性（图 2-9）。

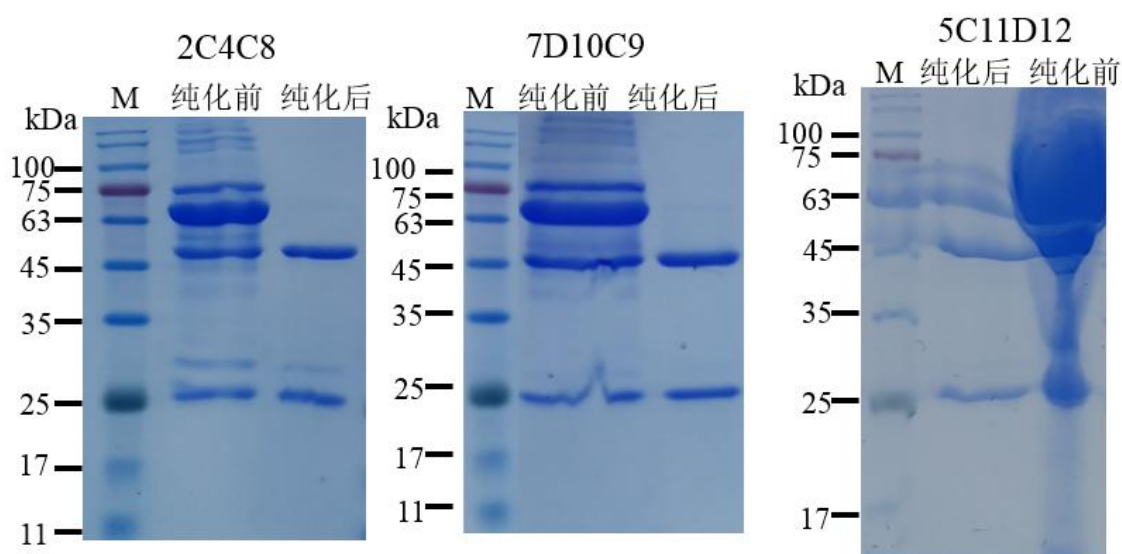


图 2-8 纯化的单克隆抗体 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2-8 SDS-PAGE identification of purified monoclonal antibodies

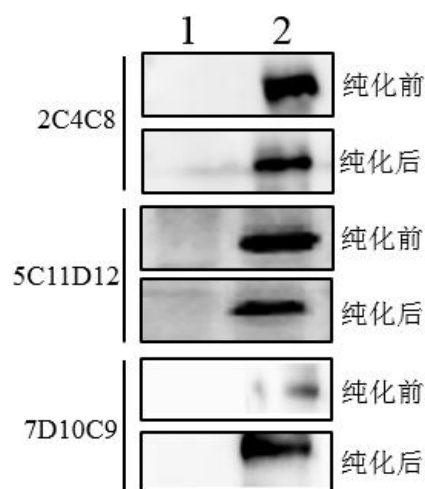


图 2-9 纯化的单克隆抗体 Western blot 鉴定

1: pCAGGS-Myc 2: pCAGGS-Myc-P72

Fig.2-9 Western blot identification of purified monoclonal antibodies

1: pCAGGS-Myc 2: pCAGGS-Myc-P72

2.4 讨论

P72 蛋白是非洲猪瘟病毒衣壳的主要成分之一,在不同 ASFV 毒株之间高度保守,并且免疫原性较好,是理想的抗原检测靶蛋白之一^[99]。因此,本研究选择 P72 蛋白作为双抗夹心 ELISA 方法的检测靶标。在诊断试剂的研发过程需要表达抗原用于单克隆抗体的制备和筛选,常见的抗原表达方式有真核表达和原核表达。其中大肠杆菌

原核表达系统具有操作便捷, 高效, 廉价的优势, 劣势就是大肠杆菌不能完成复杂的翻译后修饰。真核表达系统的优势是能够完成复杂的翻译后修饰, 但是时间周期较长, 成本较高。根据已有研究报道, ASFV P72 蛋白并没有复杂的糖基化修饰和复杂的二硫键结构^[3], 因此选择大肠杆菌表达系统完全能够胜任 P72 的抗原制备。

非洲猪瘟病毒活毒株只能在国家规定的实验室保存与研究, 因此本研究以人工合成的 P72 基因来进行克隆与表达。参照 ASFV AuhuiXCGQ 毒株序列 (GenBank 登录号: MK128995.1), 委托上海生工生物科技有限公司合成了 P72 全长基因用于原核表达。本研究成功构建了原核表达载体 pET-28a-P72, 将其转入 BL21 感受态细胞进行原核表达, 通过 PAGE 电泳检测, 证明本研究成功表达了重组 P72 蛋白, 重组蛋白 pET-28a-P72 大小为 75.9 kDa。并将重组的 P72 蛋白作为免疫小鼠的抗原, 为后续单克隆抗体的制备奠定了基础。本研究构建的真核表达载体 pCAGGS-Myc-P72, 经 Western blot 实验证明, 该质粒能够有效表达 P72-Myc 蛋白。真核表达载体的构建保障了后续单克隆抗体的验证。

制备高敏感性、高特异性的 P72 单克隆抗体是双抗夹心 ELISA 检测方法建立的重要一环。本研究选取原核表达的重组 P72 蛋白做为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠。通过有限稀释和不断的 ELISA 筛选, 成功制备出 5 株针对 P72 蛋白的特异性的单克隆抗体, 其中 2 株为 IgG₁ 型, 2 株为 IgG_{2b} 型, 1 株为 IgG_{2a} 型。通过 Western blot 和 IFA 实验证明这 5 株单克隆抗体的特异性较好, 和猪源蛋白没有任何交叉反应。

在单克隆抗体的制备过程中, 由 B 细胞和骨髓瘤细胞融合得到的杂交瘤细胞在早期十分不稳定, 容易发生突变与染色体丢失, 有可能会逐渐丧失产生抗体的能力^[12], 因此需要经过多次克隆。本研究经过了三次杂交瘤细胞的亚克隆, 通过 Western blot 实验证明得到的杂交瘤细胞均可稳定分泌针对 P72 的抗体。选取其中 3 株表达量高, 特异性和敏感性均较好的单克隆抗体进行纯化, 结果表明 3 株单克隆抗体纯化效果良好, 可用作一下步的抗原检测方法的建立。

综上, 本研究成功构建了 ASFV P72 的原核表达质粒 pET-28a-P72 与真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72, 纯化出了原核重组的 P72 蛋白; 成功制备了 5 株 P72 蛋白的单克隆抗体, 经验证, 所获得的单抗均有良好的特异性与敏感性, 为双抗夹心 ELISA 检测方法的建立奠定了基础。

第三章 非洲猪瘟病毒双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立

本研究利用纯化出的 3 株单克隆抗体作为检测抗体, 本实验室制备的兔抗 ASFV P72 多克隆抗体作为捕获抗体, 以及山羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 为标记抗体, 初步建立了检测 ASFV 的双抗体夹心 ELISA 方法, 结果表明建立的方法具有良好的灵敏度与反应性, 为 ASFV 抗原检测方法的研发奠定了基础。

3.1 实验材料

3.1.1 抗原与抗体

三株单克隆抗体为第二章中制备的 2C4C8、5C11D12、7D10C9, 检测所用的抗原为重组 pET-28a-P72 蛋白, 针对 P72 蛋白的兔源多克隆抗体由本实验室提供。标记抗体山羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 为武汉安特捷生物技术有限公司产品。

3.1.2 主要试剂配制

碳酸盐包被液: 称取 0.8 g 碳酸钠, 1.45 g 碳酸氢钠, 使用 ddH₂O 定容至 500 mL 备用。

PBST 溶液: 取高压灭菌好的 PBS 缓冲液, 加入 0.05% 的 Tween-20, 充分摇匀后置于 4℃ 备用。

封闭液 (10% 脱脂奶粉): 称取脱脂奶粉 10 g, 加入到 100 mL PBST 溶液中, 使用玻璃棒搅拌使其充分溶解, 现配现用。

终止液 (2 M 的浓硫酸): 量取 10.9 mL 的 98% 浓硫酸, 缓慢加入 89.1 mL ddH₂O 中, 一边添加浓硫酸, 一边充分混匀, 混匀后备用。

其它有关试剂同 2.1.2。

3.1.3 主要仪器

同 2.1.4。

3.2 实验方法

3.2.1 最佳多抗包被浓度的确定

用进一步制备和纯化所得的 3 株单克隆抗体 (2C4C8、5C11D12、7D10C9) 及 P72 多克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法, 对纯化的不同浓度的 P72 蛋白进行检测。为确定不同的单克隆抗体所对应的多克隆抗体包被浓度, 分别用包被 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 的 P72 多抗的酶标板对不同浓度的 P72 蛋白进行检测, 其中单抗以 1:100 稀释。采用常规的夹心 ELISA 方法, 以 pH=7.4 的磷酸盐缓冲液稀释纯化的 ASFV P72 多克隆抗体包被酶标板, 100 μL/孔, 4℃ 过夜; 采用含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 洗板 3 次, 每次 5 min; 含 10% 脱脂奶粉的 PBST 封闭酶标板, 37℃

孵育 2 h, 洗板 3 次, 每次 5 min; 加入不同浓度的 P72 蛋白, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次, 每次 3 min; 加入单克隆抗体, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板 5 次, 每次 3 min; 再加入山羊抗鼠 IgG, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 通过 TMB 底物进行显色, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 最后以 2 M 的浓硫酸 50 μ L/孔终止反应, 用多功能酶标仪读取 OD450nm 的吸光值。

3.2.2 最佳单抗稀释度的确定

以所确定的最佳多抗包被浓度包被酶标板, 将 3 株单克隆抗体均以 1:20、1:50、1:100 进行稀释, 对 10-60 μ g 的 P72 蛋白进行 ELISA 检测, 以确定单克隆抗体的最佳稀释度。

3.2.3 双抗夹心 ELISA 的灵敏度检测

为确定 3 株单克隆抗体与 P72 多克隆抗体组合后建立的双抗体夹心 ELISA 方法所能检测的 P72 抗原浓度的最低检出范围, 用确定的最佳 P72 多抗包被浓度的多抗体包被酶标板, 1:100 稀释的单克隆抗体作为检测抗体, 对 0.01-60 μ g/mL 的 p72 蛋白进行检测, 以 P/N (N 为对照组 OD450nm) > 2.1 为阳性判断依据。

3.2.4 ASFV P72 ELISA 的标准曲线

用确定的最佳 P72 多抗包被浓度的多抗体包被酶标板, 1:100 稀释的单克隆抗体作为检测抗体, 将 P72 蛋白稀释至 6 个不同的浓度, 每个浓度做 4 个重复。用建立的双抗夹心 ELISA 方法对稀释的蛋白进行检测, 并取 4 个重复的平均 OD450nm 值作为纵坐标, 蛋白浓度值作为横坐标建立 ELISA 标准曲线。

3.2.5 统计学分析

数据的统计分析使用的是 GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, CA)。使用 Tukey's test 做组间显著性分析。 $P < 0.05$ 为差异显著; $P < 0.01$ 为差异极其显著。

3.3 实验结果与分析

3.3.1 最佳多抗包被浓度的确定

用进一步制备的 3 株单克隆抗体 2C4C8、5C11D12、7D10C9 及 P72 多克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法。其中多克隆抗体包被在 ELISA 板中, 用于捕获抗原, 而单克隆抗体用于检测捕获的 P72 抗原。为确定不同的单克隆抗体所对应的多克隆抗体的最佳包被浓度, 用包被 10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL 的 P72 多抗的酶标板对不同浓度的 P72 蛋白进行检测, 其中单抗均以 1:100 稀释。2C4C8 株, 10 μ g/mL 的多抗对应的读数最高且与另外两组数据差异显著 ($P < 0.05$), 以 10 μ g/mL 作为其最佳的多抗包被浓度 (图 3-1A); 5C11D12 株, 经差异性分析显示 3 组数据之间差异不显著 ($P > 0.05$), 因此选择 10 μ g/mL 作为其最佳的多抗包被浓度 (图 3-1B); 7D10C9 株, 40 μ g/mL 的多抗对应的读数最高且与另外两组数据差异显著 ($P < 0.05$), 以 40 μ g/mL 作为其最佳的多抗包被浓度 (图 3-1C)。

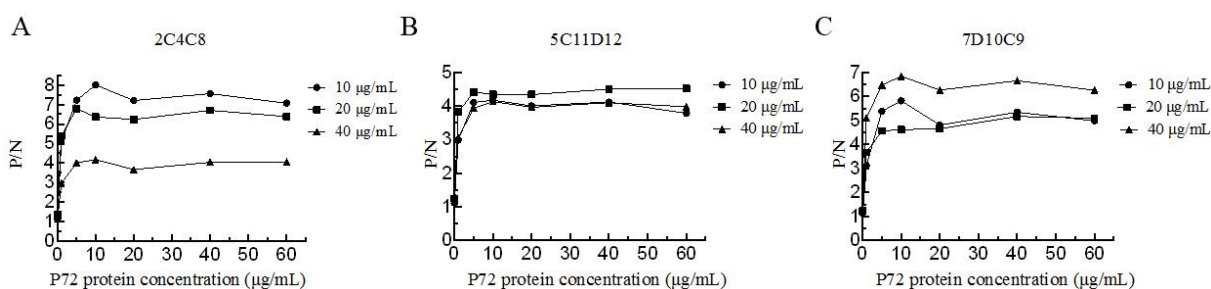


图 3-1 多抗包被浓度的确定

Fig.3-1 Determination of polyclonal antibody coating concentration

3.3.2 最佳单抗稀释度的确定

以所得的各单抗所对应的多抗的最佳浓度对酶标板进行包被, 将 3 株单抗均按 1:20、1:50、1:100 进行稀释, 对不同浓度的 P72 蛋白进行检测。根据结果进行统计学分析显示, 2C4C8 各稀释度之间差异性不显著 ($P > 0.05$), 因此以 1:100 为其最佳单抗稀释度, 终浓度为 15 µg/mL (图 3-2A); 5C11D12 稀释度 1:20 与 1:50 差异性显著 ($P < 0.05$), 稀释度 1:20 与 1:100 差异性显著 ($P < 0.05$), 而稀释度 1:50 与 1:100 差异性不显著 ($P > 0.05$), 因此以 1:100 为其最佳单抗稀释度, 终浓度为 29 µg/mL (图 3-2B); 7D10C9 稀释度 1:20 与 1:50 差异性不显著 ($P > 0.05$), 稀释度 1:50 与 1:100 差异性不显著 ($P > 0.05$), 稀释度 1:20 与 1:100 差异性显著 ($P < 0.05$), 因此以 1:100 为其最佳单抗稀释度, 终浓度为 15 µg/mL (图 3-2C)。

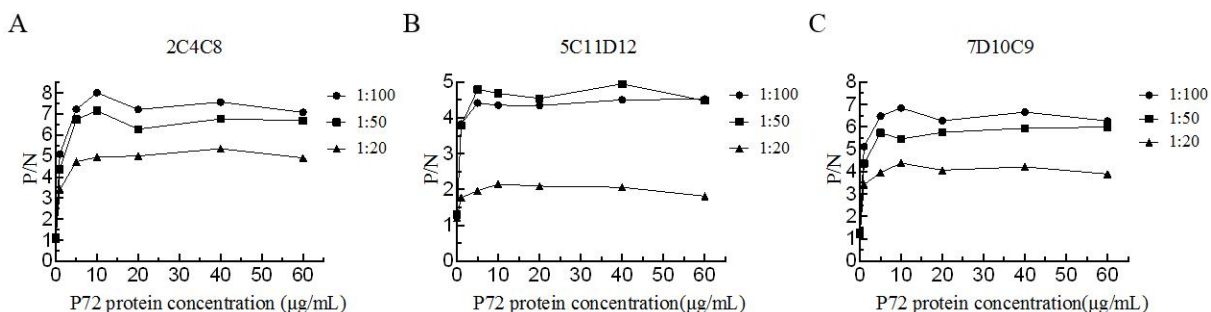


图 3-2 单抗稀释度的确定

Fig.3-2 Determination of dilution of monoclonal antibody

3.3.3 双抗夹心 ELISA 的灵敏度检测

确定 3 株单克隆抗体与 P72 多克隆抗体组合后建立的双抗体夹心 ELISA 方法所能检测的 P72 抗原浓度的最低检出范围: 将 P72 多抗按照各单抗所对应的最佳多抗包被浓度对酶标板进行包被, 以 1:100 稀释的单克隆抗体作为检测抗体, 对 0.01-60 µg/mL 的 P72 抗原进行检测, 以 P/N (N 为对照组 OD450nm) > 2.1 为阳性判断依据, 结果显示以单克隆抗体 2C4C8 与 5C11D12 为检测抗体, 对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.25 µg/mL; 以 7D10C9 为检测抗体, 对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.05 µg/mL。因此, 7D10C9 的的敏感性优于 2C4C8 和 5C11D12 (图 3-3)。

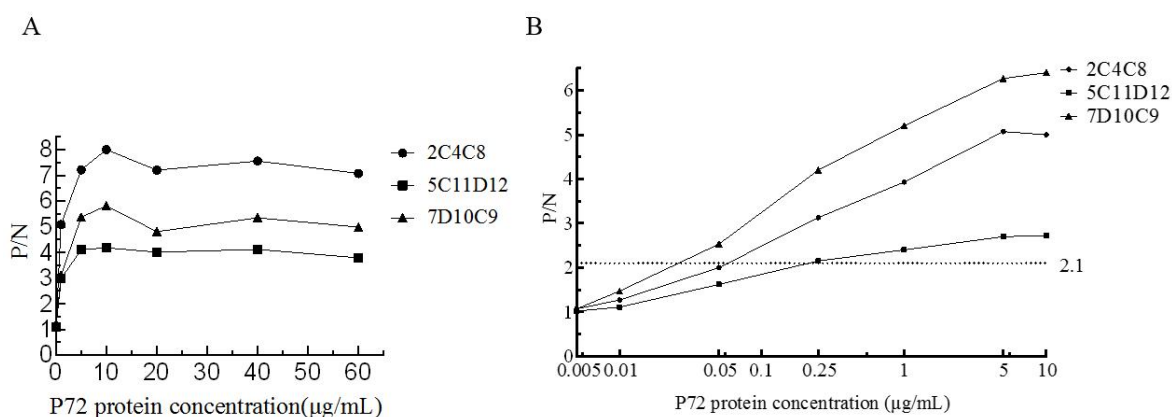


图 3-3 P72 蛋白的最低检出范围确定

Fig.3-3 The minimum detection range of P72 protein was determined

3.3.4 ASFV P72 ELISA 的标准曲线

将 P72 多抗按照各单抗所对应的最佳多抗包被浓度对酶标板进行包被，1:100 稀释的单克隆抗体作为检测抗体，将 P72 蛋白稀释至 6 个不同的浓度，每个浓度做 4 个重复。用建立的双抗夹心 ELISA 方法对稀释的蛋白进行检测，并取 4 个重复的平均 OD450nm 值作为纵坐标，蛋白浓度值作为横坐标建立 ELISA 标准曲线。结果显示，三株单克隆抗体建立的 ELISA 方法对不同浓度的 P72 抗原均表现出较好的线性关系，但是曲线的斜率较低（图 3-4）。

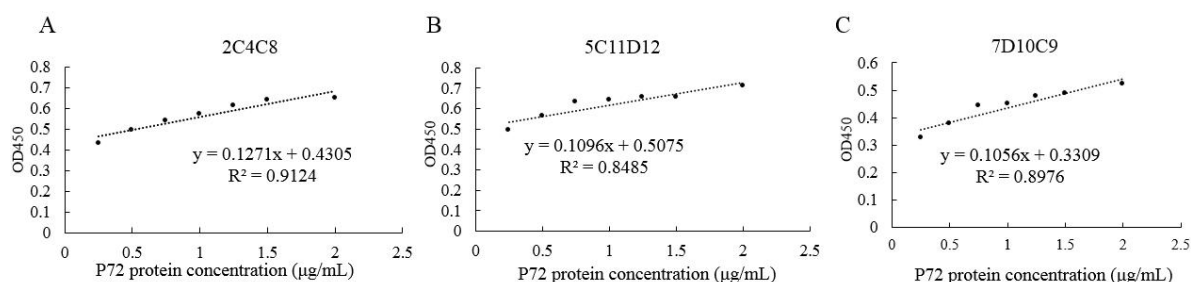


图 3-4 双抗体夹心法检测 P72 抗原的标准曲线

Fig.3-4 Standard curve of double antibody sandwich method for detection of P72 antigen

3.4 讨论

由于缺乏安全有效的非洲猪瘟疫苗，其防控主要依靠尽早的检测与扑杀。因此，可靠、有效且迅速的早期检测诊断对于非洲猪瘟的防控十分重要。目前 ASFV 病原学检测包括针对病毒本身的检测方法（病毒分离和红细胞吸附试验）以及针对病毒核酸的分子生物学检测技术。我国初期主要以核酸检测为主。但 PCR 检测对人员要求较高，且需要特殊的仪器设备，不适用于现场检测，通过检测活病毒进行诊断有一定局限性。ELISA 检测方法具备操作简单，不容易出现假阳性的特点，并且无需特殊的仪器设备，因此相较于 PCR 检测方法更容易在养殖场现场应用。因此，ASFV 抗原 ELISA 检测方法的建立对于非洲猪瘟的快速诊断和现场诊断有重要意义^[100,101]。目前国内尚

无商品化的 ASFV 双抗夹心 ELISA 检测试剂盒，而进口的双抗夹心 ELISA 试剂盒价格昂贵^[67]，使得检测成本偏高。因此，建立一种特异性强、灵敏度高的双抗夹心 ELISA 方法很有帮助。

本研究用纯化后的单克隆抗体与本实验室提供的 P72 兔源多克隆抗体组合，通过对多抗包被浓度及单克隆抗体稀释浓度的优化，初步建立了检测 ASFV 的双抗夹心 ELISA 方法。选取多克隆抗体作为捕获抗体可以保障检测的敏感性，因为多克隆体能够识别抗原的多个表位，亲和力往往较单一一株单克隆抗体要高，但其相比于单克隆抗体，特异性较差，容易产生交叉反应，导致检测的本底值较高。

在建立双抗夹心 ELISA 检测方法的过程中，我们观察到多克隆抗体的包被浓度提高，P/N 读数反而下降（图 3-1），出现这一现象的原因是由于多克隆抗体的特异性较差，随着多克隆抗体用量的增加，阴性对照的 OD450 读数上升过高，导致 P/N 的数值下降。在将来的研究中，如果能够用 1 株，或者多株高亲和力的 P72 单克隆抗体来代替多克隆抗体，有可能能够进一步降低非特异性反应，提高检测的敏感性。

通过比较多克隆抗体的最佳包被浓度和各单抗的最佳稀释比，可知 2C4C8 所对应的多克隆抗体的最佳包被浓度和单克隆抗体的最佳稀释比均较低，更适合用于双抗体夹心 ELISA 制备试剂盒。但采用 2C4C8 所对应的最佳多抗包被浓度和最佳稀释度组合来检测各单抗所对应的最低检测抗原浓度时，发现在同样的组合条件下 7D10C9 的灵敏度相对更高。因此三株纯化的单抗中 7D10C9 可能更适合用于进一步优化后双抗体夹心 ELISA 制备试剂盒或胶体金检测试剂盒的制备。ASFV 是我国的一类动物疫病，受限于严格的生物安全管理措施，获得活病毒存在一定的困难。因此在制备单克隆抗体时，未能在病毒感染情况下验证单克隆抗体。在建立双抗夹心 ELISA 时，未能用建立的检测方法对病毒进行检测。均仅限于用 P72 蛋白进行检测和验证，使得实验结果与病毒感染情况可能存在偏差，有待更多的实验进行验证。

使用建立的双抗夹心 ELISA 检测方法对重组 P72 蛋白进行检测，结果显示以单克隆抗体 2C4C8 与 5C11D12 为检测抗体，对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ；以 7D10C9 为检测抗体，对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ，表明所建立的双抗夹心 ELISA 方法中 7D10C9 能够带来更高的检测敏感性。对这一现象存在两种可能的解释：1）可能因为单克隆抗体 7D10C9 和 P72 蛋白的亲和力较其他 2 株单克隆抗体更高；2）有可能是多克隆抗体针对的表位和单克隆抗体 7D10C9 重合较少，但是和单克隆抗体 2C4C8，5C11D12 针对的表位重合较多。也有可能这两个原因同时存在。使用建立的双抗夹心 ELISA 检测方法对原核表达的 P72 蛋白进行检测，得到了检测 P72 抗原的标准曲线（图 3-4）。这 3 株单克隆抗体对应的标准曲线的斜率较低，这可能和多克隆抗体作为捕获抗体有关系。多克隆抗体针对多个抗原表位，有可能会封闭掉一部分单抗结合的表位，导致随着抗原量的增加，ELISA 的读数的上升比较缓慢。

以上结果显示本研究所建立的 ELISA 方法能够用于 ASFV P72 抗原的检测，具备较好的敏感性和特异性。但本研究也存在一些缺憾，首先，本研究建立的检测方法

没有进行系统的特异性测试，虽然我们制备的抗体与猪源蛋白没有交叉反应，但是仍然需要使用其他常见的猪的病毒来测试检测方法的特异性；其次，未与同类产品进行符合性比较，也并未获取临床样品进行检验，其特异性与符合率需要进一步的研究；第三，本研究建立的检测方法没有对 ASFV 全病毒的样品进行特异性和敏感性测试；在将来的研究中，我们计划联合有 ASFV 研究资质的单位共同测试该方法对检测 ASFV 全病毒的敏感性和特异性。

综上，本研究初步建立了针对 ASFV P72 的双抗夹心 ELISA 方法，建立的方法具有良好的灵敏度，为进一步研发 ASFV 的检测试剂盒打下了基础。

结 论

1.本研究成功构建了 ASFV P72 基因的原核表达质粒 pET-28a-P72, 表达纯化了 P72 原核重组蛋白, 为制备单克隆抗体打下了基础; 同时构建了真核表达质粒 pCAGGS-Myc-P72, 为后续单克隆抗体的筛选和验证打下了基础。

2.本研究以原核表达的重组 P72 蛋白为免疫原, 免疫 BALB/c 小鼠, 制备了 5 株 P72 蛋白的单克隆抗体: 2C4B8 (IgG₁)、2C4C8 (IgG₁)、5C11D12 (IgG_{2b})、5C11F11 (IgG_{2b}) 及 7D10C9 (IgG_{2a}), 验证表明 5 株单抗均具有良好的特异性与反应性。

3.本研究以纯化的 3 株 P72 单克隆抗体为检测抗体, 本实验室制备的 ASFV P72 兔源多克隆抗体作为捕获抗体, 以及山羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 为标记抗体, 初步建立了检测 ASFV 的双抗体夹心 ELISA 方法。使用重组 P72 蛋白为检测抗原对检测方法进行优化和评价, 显示本研究建立的双抗夹心 ELISA 方法具有较好的敏感性, 其中以单克隆抗体 2C4C8 与 5C11D12 为检测抗体, 对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.25 $\mu\text{g/mL}$; 以 7D10C9 为检测抗体, 对重组 P72 蛋白的检测下限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。三株单克隆抗体建立的 ELISA 方法对不同浓度的 P72 抗原均表现出较好的线性关系。综上所述, 本研究建立的双抗夹心 ELISA 方法为 ASFV 抗原 ELISA 检测试剂盒的研发提供了重要材料, 并且打下了实验基础。

参考文献

- [1] Guo F, Shi Y, Yang M, et al. The structural basis of African swine fever virus core shell protein p15 binding to DNA[J]. The FASEB Journal, 2021, 35(3): e21350.
- [2] Koonin E V, Yutin N. Origin and evolution of eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses[J]. Intervirology, 2010, 53(5): 284-292.
- [3] Wang Guoguo et al. Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins[J]. Viruses, 2021, 13(11) : 2124-2124.
- [4] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. Journal of virology, 2018, 92(23): e01293-18.
- [5] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt J A. African swine fever virus biology and vaccine approaches[J]. Advances in virus research, 2018, 100: 41-74.
- [6] Karger A, Pérez-Núñez D, Urquiza J, et al. An update on African swine fever virology[J]. Viruses, 2019, 11(9): 864.
- [7] Qun-Yi C H H U A, Gang D. The advancement on molecular biology of African swine fever virus[J]. Microbiology, 2007, 34(3):0572-04.
- [8] Garcia-Beato R, Salas M L, Vinuela E, et al. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA[J]. Virology, 1992, 188(2): 637-649.
- [9] Rojo G, García-Beato R, Viñuela E, et al. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells[J]. Virology, 1999, 257(2): 524-536.
- [10] Reis A L, Netherton C, Dixon L K. Unraveling the armor of a killer: evasion of host defenses by African swine fever virus[J]. Journal of virology, 2017, 91(6): e02338-16.
- [11] Li C, Chai Y, Song H, et al. Crystal structure of African swine fever virus dUTPase reveals a potential drug target[J]. MBio, 2019, 10(5): e02483-19.
- [12] 杨晓红. 非洲猪瘟病毒 P72 基因单克隆抗体的制备及其重组杆状病毒的构建[D]. 华中农业大学, 2012.
- [13] Turner C, Williams S M, Burton C H, et al. Pilot scale thermal treatment of pig slurry for the inactivation of animal virus pathogens[J]. Journal of Environmental Science & Health Part B, 1999, 34(6): 989-1007.
- [14] Cunliffe H R, Blackwell J H, Walker J S. Glutaraldehyde inactivation of exotic animal viruses in swine heart tissue[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(5): 1044-1046.
- [15] Zhang L, Luo Y, Wang W, et al. Efficient inactivation of African swine fever virus by ozonized water[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 247: 108796.
- [16] 殷婕. 非洲猪瘟病毒的活性与灭活[J]. 兽医导刊, 2019(11):13-14.
- [17] 杨瑞梅, 李桂梅, 秦志华, 等. 非洲猪瘟后某猪场猪舍内的消毒程序及效果评价[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(1):4.

- [18] Stone S S, Hess W R. Effects of some disinfectants on African swine fever virus[J]. *Applied microbiology*, 1973, 25(1): 115-122.
- [19] Dixon L K, Chapman D A G, Netherton C L, et al. African swine fever virus replication and genomics[J]. *Virus research*, 2013, 173(1): 3-14.
- [20] 张赫. 非洲猪瘟病毒 CP204L 基因的原核表达与单抗制备[D].内蒙古农业大学, 2021.
- [21] Neilan J G, Zsak L, Lu Z, et al. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection[J]. *Virology*, 2004, 319(2): 337-342.
- [22] Borca M V, Irusta P, Carrillo C, et al. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope[J]. *Virology*, 1994, 201(2): 413-418.
- [23] Lithgow P, Takamatsu H, Werling D, et al. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection[J]. *Veterinary microbiology*, 2014, 168(2-4): 413-419.
- [24] Chen X, Yang J, Ji Y, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing African swine fever virus protein 72 is safe and immunogenic in mice[J]. *Virologica Sinica*, 2016, 31(2): 150-159.
- [25] Sastre P, Pérez T, Costa S, et al. Development of a duplex lateral flow assay for simultaneous detection of antibodies against African and Classical swine fever viruses[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(5): 543-549.
- [26] Haines F J, Hofmann M A, King D P, et al. Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses[J]. *PloS one*, 2013, 8(7): e71019.
- [27] Luo Y, Atim S A, Shao L, et al. Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus[J]. *Archives of virology*, 2017, 162(1): 191-199.
- [28] Ronish B, Hakhverdyan M, Ståhl K, et al. Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus[J]. *Journal of virological methods*, 2011, 172(1-2): 8-15.
- [29] Rodriguez F, Ley V, Gómez-Puertas P, et al. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability[J]. *Virus research*, 1996, 40(2): 161-167.
- [30] Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo J M, et al. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response[J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.
- [31] Hernaez B, Escribano J M, Alonso C. Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera[J]. *Virology*, 2006, 350(1): 1-14.
- [32] Gallardo C, Mwaengo D M, Macharia J M, et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes[J]. *Virus genes*, 2009, 38(1): 85-95.

- [33] García-Mayoral M F, Rodríguez-Crespo I, Bruix M. Structural models of DYNLL1 with interacting partners: African swine fever virus protein p54 and postsynaptic scaffolding protein gephyrin[J]. FEBS letters, 2011, 585(1): 53-57.
- [34] Rodríguez J M, García-Escudero R, Salas M L, et al. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites[J]. Journal of virology, 2004, 78(8): 4299-4313.
- [35] Gallardo C, Blanco E, Rodríguez J M, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells[J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(3): 950-956.
- [36] Gómez-Puertas P, Escribano J M. Blocking antibodies inhibit complete African swine fever virus neutralization[J]. Virus research, 1997, 49(2): 115-122.
- [37] Hernáez B, Díaz-Gil G, García-Gallo M, et al. The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis[J]. FEBS letters, 2004, 569(1-3): 224-228.
- [38] Sánchez E G, Quintas A, Nogal M, et al. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis[J]. Virus research, 2013, 173(1): 58-75.
- [39] Hernaez B, Escribano J M, Alonso C. African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection[J]. FEBS letters, 2008, 582(23-24): 3275-3280.
- [40] Barderas M G, Rodriguez F, Gomez-Puertas P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins[J]. Archives of virology, 2001, 146(9): 1681-1691.
- [41] Oviedo J M, Rodriguez F, Gomez-Puertas P, et al. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents[J]. Journal of virological methods, 1997, 64(1): 27-35.
- [42] Giménez-Lirola L G, Mur L, Rivera B, et al. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161230.
- [43] Argilaguet J M, Pérez-Martín E, Gallardo C, et al. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells[J]. Vaccine, 2011, 29(33): 5379-5385.
- [44] Argilaguet J M, Pérez-Martín E, Nofrías M, et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies[J]. 2012, 7: e40942.
- [45] Galindo I, Almazán F, Bustos M J, et al. African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells[J]. Virology, 2000, 266(2): 340-351.
- [46] Pérez-Núñez D, García-Urdiales E, Martínez-Bonet M, et al. CD2v interacts with adaptor protein AP-1 during African swine fever infection[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123714.

- [47] Dixon L K, Abrams C C, Bowick G, et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2004, 100(3-4): 117-134.
- [48] Tulman E R, Delhon G A, Ku B K, et al. African swine fever virus[J]. *Lesser known large dsDNA viruses*, 2009: 43-87.
- [49] Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman E R, et al. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(7): 1670-1675.
- [50] Gonzalvo F R, Coll J M. Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells[J]. *Virology*, 1993, 196(2): 769-777.
- [51] Zsak L, Burrage T G, Neilan J G, et al. African swine fever virus CD2-like protein mediates monocyte infection-inhibition[J]. *XVII International Poxvirus, Asfivirus, and Iridovirus Symposium* June, 2010: 5-10.
- [52] Frączyk M, Woźniakowski G, Kowalczyk A, et al. Evolution of African swine fever virus genes related to evasion of host immune response[J]. *Veterinary microbiology*, 2016, 193: 133-144.
- [53] Leitão A, Cartaxeiro C, Coelho R, et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(3): 513-523.
- [54] Montgomery R E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony)[J]. *Journal of comparative pathology and therapeutics*, 1921, 34: 159-191.
- [55] Matthias Kramera et al. Scientific review on Classical Swine Fever[J]. *EFSA Supporting Publications*, 2009, 6(8).
- [56] Arias M, Sánchez-Vizcaíno J M. African swine fever eradication: the Spanish model. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman JJ, editors[J]. 2002;133–139.
- [57] Vepkhvadze N G, Menteshashvili I, Kokhraidze M, et al. Active surveillance of African swine fever in domestic swine herds in Georgia, 2014[J]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2017, 36(3): 879-887.
- [58] Cwynar P, Stojkov J, Wlzlak K. African swine fever status in Europe[J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 310.
- [59] Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, et al. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012[J]. *Virus research*, 2013, 173(1): 198-203.
- [60] Oie.int. Available online: <https://wahis.oie.int/> (accessed on 1 April 2022).
- [61] Guinat C, Gogin A, Blome S, et al. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions[J]. *Veterinary Record*, 2016, 178(11): 262-267.
- [62] 曹云雷. ASFV 免疫保护相关抗原的抗体制备及应用[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [63] Penrith M L, Vosloo W. Review of African swine fever: transmission, spread and control[J]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2009, 80(2): 58-62.

- [64] Ravaomanana J, Jori F, Vial L, et al. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north - western Madagascar[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2011, 58(3): 247-254.
- [65] 肖琦. ASFV p30 和 SARS-CoV-2 N 的单克隆抗体制备[D].江西农业大学, 2021.
- [66] Ravaomanana J, Jori F, Vial L, et al. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north - western Madagascar[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2011, 58(3): 247-254.
- [67] 张丽. 基于 p54 蛋白单克隆抗体的非洲猪瘟病毒抗原检测方法的建立[D]. 中国农业科学院.
- [68] 邹秋萍, 纪新花, 赵静. 非洲猪瘟综合防控措施[J]. *畜牧兽医科学(电子版)*, 2020(04):45-46.
- [69] 储德文. 非洲猪瘟病毒 p30 重组蛋白的表达及单克隆抗体制备[D].扬州大学, 2013.
- [70] Jenson J S, Childerstone A, Takamatsu H H, et al. The cellular immune recognition of proteins expressed by an African swine fever virus random genomic library[J]. *Journal of immunological methods*, 2000, 242(1-2): 33-42.
- [71] Blome S, Gabriel C, Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation[J]. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3879-3882.
- [72] Sánchez - Vizcaíno J M, Mur L, Martínez - López B. African swine fever: an epidemiological update[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2012, 59: 27-35.
- [73] Arias M, De la Torre A, Dixon L, et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines[J]. *Vaccines*, 2017, 5(4): 35.
- [74] Afonso C L, Zsak L, Carrillo C, et al. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79(10): 2543-2547.
- [75] Lewis T, Zsak L, Burrage T G, et al. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(3): 1275-1285.
- [76] Salguero F J, Gil S, Revilla Y, et al. Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus (E-70) deleted on A238L[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2008, 124(1-2): 107-119.
- [77] Carlson J, O'Donnell V, Alfano M, et al. Association of the host immune response with protection using a live attenuated African swine fever virus model[J]. *Viruses*, 2016, 8(10): 291. -305.
- [78] Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo J M, et al. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response[J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.
- [79] 马兴树, 宋金祥. 非洲猪瘟病毒免疫及基因工程疫苗研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2019,46(11):3404-3413.
- [80] Ivanov V, Efremov E E, Novikov B V, et al. Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pigs infected by African swine fever virus[J]. *Molecular medicine reports*, 2011, 4(3): 395-401.

- [81] Ruiz-Gonzalvo F, Rodriguez F, Escibano J M. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus[J]. Virology, 1996, 218(1): 285-289.
- [82] Lokhandwala S, Waghela S D, Bray J, et al. Induction of robust immune responses in swine by using a cocktail of adenovirus-vectored African swine fever virus antigens[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2016, 23(11): 888-900.
- [83] Lopera-Madrid J, Osorio J E, He Y, et al. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine[J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2017, 185: 20-33.
- [84] 董红艳. 简析非洲猪瘟病毒快速检测方法研究进展[J].中国畜禽种业, 2022,18(02):79-80.
- [85] 苗春, 李伟, 杨思成, 邵军军, 常惠芸. 非洲猪瘟诊断技术研究进展[J].中国动物检疫, 2022,39(01):82-89.
- [86] 李艳, 张煜轩, 等. 非洲猪瘟病毒 LNA 引物 PCR 检测方法的建立及优化[J].中国农学通报, 2021,37(29):107-113.
- [87] 王翠, 许宗丽, 等. 非洲猪瘟病原学检测技术研究进展[J].中国动物检疫, 2022,39(02):74-81.
- [88] King D P, Reid S M, Hutchings G H, et al. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus[J]. Journal of virological methods, 2003, 107(1): 53-61.
- [89] 王梓莹, 但琨, 施远国, 阚式斌, 钟雷响, 何庆华. 非洲猪瘟病毒的快速检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2020,11(10):3215-3220.
- [90] Wang D, Yu J, Wang Y, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV)[J]. Journal of virological methods, 2020, 276: 113775.
- [91] Vidal M I, Stiene M, Henkel J, et al. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies[J]. Journal of virological methods, 1997, 66(2): 211-218.
- [92] 郭晶, 孟庆玲, 乔军, 李重阳, 伍晔晖, 王立霞, 马帅, 才学鹏. ASFV 多表位融合基因 MeP72 基因的克隆、表达及其间接 ELISA 检测方法建立[J].生物技术, 2018,28(06):548-553.DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2018.06.0095.
- [93] 吴海涛, 成大荣, 吴萌, 等. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(17):4.
- [94] 林彦星, 曹琛福, 等. 非洲猪瘟病毒抗体量子点检测试纸条的研制[J].中国兽医科学, 2017,47(10):1214-1220.
- [95] Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation[J]. Virus research, 2019, 271: 197676.
- [96] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975, 256(5517): 495-497.

- [97] 蒋卉, 胡志强. 单克隆抗体药物的技术发展和应用进展[J]. 山东化工, 2020,49(06):77-78.
- [98] 潘艳, 张昕. 单克隆抗体技术的研究进展[J]. 吉林工商学院学报, 2014,30(05):88-90+120.
- [99] Geng R, Sun Y, Li R, et al. Development of a p72 trimer-based colloidal gold strip for detection of antibodies against African swine fever virus[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022: 1-12.
- [100] 宋浩, 张丽, 张交儿, 等. 非洲猪瘟流行病学及诊断技术研究进展. 中国兽医学报: 1-16.
- [101] 何健, 石建州, 刘阳坤, 等. 非洲猪瘟病毒研究进展[J]. 南阳师范学院学报, 2022,21(01):55-62.

致 谢

时光飞逝，岁月荏苒，转眼间，三年的研究生学习生涯就要结束。在江西农业大学度过的三年学习时光，是我人生中宝贵的财富。短短的三年时光，却让我收获颇丰。不再有刚入学时的青涩与懵懂，而多了几分成熟与稳重。在本论文完成之际，我衷心感谢在研究生学习生活中对我提供帮助与支持的老师、同学与朋友们！

首先感谢我的硕士导师张锦华老师，张老师学识渊博，为人和蔼，不仅在科研上为我们提供细心的指导，生活中对我们也十分关心，教导我们要能够全面的发展与成长。感谢我的实验指导老师丁珍老师，丁老师治学严谨，精益求精，对待科研一丝不苟，让我能够在科研上稳步前行。感谢胡睿铭老师对我在科研与学习上提供的帮助，胡老师教会我许多科研知识与技能，对待科研的严谨态度对我影响深远。感谢预防教研室唐玉新老师、何后军老师、王萍老师、邓舜洲老师、邬向东老师、张文波老师、戴益民老师在实验上提供的支持，为我们的实验室创造了良好的实验环境。感谢课题组叶昱老师、宋德平老师、黄冬艳老师和吴琼老师对我的关心和帮助。

科研与生活中都离不开同学们的帮助。感谢陈君师姐对我的关心与帮助，初入实验室，陈君师姐带我进行科研学习，在繁忙的科研中对我耐心地指导，教会我很多实验技能。感谢课题组陈佳佳师姐、张誉瀚师兄、顾俊师兄、肖琦师姐、李指全师兄、袁为锋师兄、毕箴师姐在实验细节上对我提供的帮助。感谢同级同学曾川、叶以哲、赵敏、田梦婷、江宁对我的帮助与支持。感谢课题组任妍锦、陈金凤、叶培、谢林梅、梁雯棋、刘濠几位师妹对我的大力支持，实验的顺利进行离不开她们的帮助。

特别感谢我的父母与家人们，对即将到而立之年的我仍无微不至的照顾，无论遇到何种挫折，他们都会给予最无私的爱与关怀，养育之恩，无以为报。感谢远方的她，纵使相隔千里，千般不易，却总是在我低落与失意的时候聆听我的心声，和我一起分享快乐与忧愁，谢谢你的陪伴！

最后，感谢预防兽医学教研室，为我提供向上攀登的平台。感谢参与论文评审、答辩和在教学中默默无私奉献的老师，老师你们辛苦了！感谢所有在研究生生活中帮助过我的人！