硕士专业学位 文 论

非洲猪瘟 I226R 的功能研究及 相关 ELISA 检测方法建立

李亚波

廣西大學

二〇二三 年 六 月

分类号_	S852.6	学校代码10593
密级	公开	学号 <u>2018393029</u>

硕士专业学位论文

非洲猪瘟 I226R 的功能研究及相关 ELISA 检测方法建立 Functional Study of African Swine Fever I226R and Establishment of ELISA Detection

Methods

作者姓名:	李亚波
指导教师 :	刘文军 研究员; 李晓宁 讲师
合作导师 :	郑敏 研究员
专业名称:	兽医
研究方向:	动物疫病防控与检疫
所在学院:	动物科学技术学院

论文答辩日期 <u>2023 年 5 月 26 日</u> 学位授予日期 <u>2023 年 6 月</u> 答辩委员会主席 <u>韦祖樟教授</u>

非洲猪瘟 I226R 的功能研究及相关 ELISA 检测方法建立

摘要

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的以高热、高接触为特征的烈性动物 疫病,能感染各个年龄段的家猪和野猪。2018 年该病毒在我国本土 首次广泛传播,给国内的生猪肉市场稳定和食品安全带来巨大冲击。 然而由于 ASFV 基因组庞大,编码蛋白复杂且数量多,目前尚未有获 批上市的疫苗可用。疫情防控停留在早期预防和扑杀的阶段。因此 ASFV 的早期监测对防控工作具有重要意义。

环磷酸鸟苷-腺苷合酶(cGAS)是 2013 年陈志坚等人首次发现 的一种新的胞内 DNA 感受器, cGAS 负责识别外源致病性 DNA 及机 体自身的异常 DNA, cGAS 与 dsDNA 组合成 cGAS-dsDNA 寡聚复合 物,从而促进 cGAMP 的生成,进而刺激下游接头蛋白 STING 的构 象改变促进其活化转位,进一步激活 cGAS-STING 信号通路的抗病 毒天然免疫反应,实现机体的自我防御功能。ASFV 是 DNA 病毒, 入侵后在宿主细胞内进行复制,其 DNA 片段作为一种病原相关分子 模式(Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs)很容易被 cGAS 等 DNA 识别受体识别,进一步激活下游的干扰素转录。

I226R 作为 ASFV 的毒力基因之一,在 ASFV 的整个感染周期均能检测到,而 pI226R 抑制 cGAS-STING 通路的具体机制还未见报道。

Ι

本研究旨在:探究 pI226R 调控 cGAS-STING 信号通路的分子机制, 为 ASFV 的免疫逃逸机制作进一步补充。另一方面利用大肠杆菌原核 表达系统表达并纯化了 ASFV I226R 蛋白,基于此建立了间接 ELISA 方法。全文研究内容概括为:

1、通过双荧光素酶报告基因系统实验、荧光定量 PCR 实验证明 了 pI226R 对 cGAS-STING 信号通路的抑制作用。

2、通过免疫共沉淀实验和和共聚焦实验表明 pI226R 与 cGAS 相 互作用,并对 cGAS 进行降解;通过 Western blot 分析得到 pI226R 的 过表达能够降解 cGAS 并减弱 cGAS 与 E3 连接酶 TRIM56 的相互作 用,导致 cGAS 的单泛素化减弱,从而抑制了 cGAS 的活化和 cGAS-STING 通路的激活。

3、构建了原核表达质粒和真核表达质粒;进行温度和时间的优 化后实现了蛋白的大量表达,得到了高纯度的重组 I226R 蛋白,浓度 约为1 mg/mL;制备了具良好特异性的鼠源多克隆抗体。

4、基于 ASFV 重组 I226R 蛋白建立了间接 ELISA 血清学检测方法,通过优化 ELISA 的实验条件,得到了很好的特异性、重复性和灵敏性。

关键词: 非洲猪瘟 ELISA 抗病毒天然免疫

II

Functional study of African swine fever I226R and establishment of ELISA detection methods

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a acute animal disease caused by African swine fever virus (ASFV) characterized by high fever and high contact, which can infect domestic pigs and wild boars of all ages. The virus spread widely in China for the first time in 2018, causing a huge impact on the stability of the domestic raw pork market and food safety. However, due to the large size of the ASFV genome, the complexity and number of the proteins encoded, there is no currently approved vaccine available, The prevention and control of the epidemic remains at the stage of early prevention and culling. Therefore, early monitoring of ASFV is of great significance for prevention and control.

Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) is a novel intracellular DNA receptor first discovered by Chen Zhijian et al. in 2013. cGAS can identify not only foreign pathogenic DNA, but also its own abnormal DNA. cGAS and dsDNA are combined into cGAS-dsDNA oligomeric complexes, thereby promoting the production of cGAMP, thereby stimulating the conformational change of the downstream linker protein STING to promote its activation transposition, further activating the antiviral innate immune response of the cGAS-STING signaling pathway, and realizing the body's self-defense function. As a DNA virus, ASFV replicates in host cells after invasion, and its DNA fragments are easily recognized by DNA recognition receptors (such as cGAS), as a Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), further activating downstream interferon transcription.

I226R is one of the virulence genes of ASFV, which can be detected throughout the infection cycle of ASFV. Since the specific mechanism of pI226R suppression of the cGAS-STING pathway has not been reported. This study aimed to explore the molecular mechanism of pI226R regulating cGAS-STING signaling pathway, for further supplement the immune escape mechanism of ASFV. On the other hand, the Escherichia coli prokaryotic expression system was used to express and purify ASFV I226R protein, and an indirect ELISA method based on I226R protein was established. The contents of the study is summarized as:

1. The inhibitory effect of pI226R on the cGAS-STING signaling pathway was verified by dual-luciferase reporter assay system and fluorescence quantitative PCR experiment.

2. It was proved that pI226R interacted with cGAS through co-immunoprecipitation experiments and fluorescence confocal experiments. Western blot analysis showed that the overexpression of pI226R promoted cGAS degradation and decreased the interaction between cGAS and E3 ligase TRIM56, resulting in the weakened

IV

monoubiquitination of cGAS, thus inhibiting the activation of cGAS and the activation of cGAS-STING pathway.

3. The prokaryotic expression plasmid and eukaryotic expression plasmid were constructed; and a large quantity of I226R was expressed by optimizing the temperature and time, and a high-purity recombinant I226R protein was obtained after purification, with a concentration of about 1 mg/mL. It was prepared a murine polyclonal antibody of I226R which had great specificity.

4. A related indirect ELISA serological detection method was established based on ASFV I226R protein, and excellent specificity, repeatability and sensitivity were obtained by optimizing the experimental conditions of ELISA.

Keywords: African swine fever; ELISA; antiviral natural immunity

V

中英文缩写对照表

英文缩写	英文名称	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
bp	Base pair	碱基对
cGAMP	Cyclic GMP-AMP	环磷酸鸟苷腺苷
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	环磷酸鸟苷-腺苷酸合成
CHX	Cycloheximide	呣 环已亚胺(放线菌酮)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
ddH ₂ O	Distilled and deionized water	双蒸水
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
dsDNA	Double-stranded DNA	双链 DNA
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DMEM	Dulbecco Minimum Essential Medium	细胞培养基
DEPC 水	DNase/RNase-Free Water	无酶无菌水
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IFA	Immunofluorescence assay	间接免疫荧光测定
IFN-α	Interferon-a	干扰素-α
IFN-β	Interferon-β	干扰素-β
IPTG	Isopropy-β-D-thiogalactoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3	干扰素调节因子 3
ISG15	Interferon Stimulated Gene 15	干扰素刺激基因 15

ISG54	Interferon Stimulated Gene 54	干扰素刺激基因 54
ISG56	Interferon Stimulated Gene 56	干扰素刺激基因 56
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani	LB 液体培养基
OD	Optical density	光密度
PAMP	Pathogen associated molecule pattern	病原体相关分子模式
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PBST	Phosphate buffered solution/Tween-20	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯膜
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
rpm	round per minute	每分钟转数
qPCR	Real-time fluorescent quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
STING	Stimulator of interferon genes	干扰素基因刺激蛋白
TAE	Tris acetic acid EDTA	核酸电泳缓冲液
WB	Western Blot	免疫印迹试验

目 录

第一章	绪论	1
1.1 非	洲猪瘟概述	1
1.1.1	非洲猪瘟流行病学和传播特征	1
1.2 非	洲猪瘟病毒概述	2
1.3 AS	FV 主要蛋白研究	3
1.3.1	外囊膜层	3
1.3.2	衣壳层	3
1.3.3	内膜层	4
1.3.4	核衣壳层	4
1.3.5	核酸 DNA 层	4
1.3.6	抑制 I 型干扰素信号通路和 NF-кB 信号通路	4
1.3.7	与细胞凋亡相关的 ASFV 蛋白	5
1.4 AS	FV 检测方法研究进展	6
1.4.1	病原学检测	6
1.4.2	血清学检测	8
1.5 AS	FV疫苗研究进展	9
1.5.1	灭活疫苗	9
1 5 0		\mathbf{n}
1.5.2	_ 顾 毒 活 没 铂 (LAV s)	9
1.5.2 1.5.3	碱毒活疫苗(LAVs)	9 0
1.5.2 1.5.3 1.6 研	碱毒活疫苗(LAVs) 亚单位疫苗、DNA 疫苗和病毒载体疫苗10 究目的及意义1	9 0 1
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1	碱毒活疫苗(LAVs) 亚单位疫苗、DNA 疫苗和病毒载体疫苗	9 0 1 1
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2	碱毒活疫苗(LAVs) 亚单位疫苗、DNA 疫苗和病毒载体疫苗	9 0 1 1 1
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章	减毒活疫苗(LAVs)	9 0 1 1 1 2
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材	减毒活没亩(LAVs)	9 0 1 1 1 2 2
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1	减毒活疫苗(LAVs)	9 0 1 1 1 2 2
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2	减毒活没亩(LAVs)	9 0 1 1 1 2 2 2 2
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3	减每活没亩(LAVs)	9 0 1 1 1 2 2 2 3
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4	减每活没铂(LAVs)	9 0 1 1 1 2 2 2 3 3
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5	减毒活疫苗(LAVs)	90111222334
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.2 方	减毒活疫苗(LAVs)	901112223344
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.2 方 2.2.1	赋每洁殁田(LAVS)	90111222233444
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.2 方 2.2.1 2.2.2	赋每活殁亩(LAVs)	901112222334445
1.5.2 1.5.3 1.6 研 1.6.1 1.6.2 第二章 2.1 材 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.2.5 2.2.1 2.2.2 2.2.3	减每活役田(LAVs)	9011122223344456

2.2.5 荧光共聚焦实验	18
2.2.6 免疫共沉淀试验	18
2.3 结果	19
2.3.1 pI226R 抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素的激活	19
2.3.2 pI226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化	20
2.3.3 cGAS 是 pI226R 抑制 cGAS-STING 通路激活的靶蛋自	∃.21
2.3.4 pI226R 通过自噬途径降解 cGAS	23
2.3.5 pI226R 影响 cGAS 活化	23
2.4 讨论	25
2.5 小结	27
第三章 重组蛋白 I226R 表达与纯化	28
3.1 材料	28
3.1.1 细胞与菌株	28
3.1.2 主要载体、试剂	28
3.1.3 所使用的主要仪器	30
3.1.4 实验动物	30
3.2 方法	30
3.2.1 I226R 基因的引物设计	30
3.2.2 I226R 基因扩增克隆及质粒构建	30
3.2.3 重组质粒的原核表达以及纯化	32
3.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳	33
3.2.5 考马斯亮蓝染色	33
3.2.6 免疫印迹分析	33
3.2.7 多克隆抗体的制备	34
3.2.8 BCA 法测定蛋白浓度	34
3.3 结果	35
3.3.1 ASFV I226R 基因克隆以及原核表达质粒构建	35
3.3.2 ASFV I226R 基因克隆以及真核表达质粒构建	36
3.3.3 原核表达诱导条件筛选	37
3.3.4 重组蛋白表达形式鉴定以及纯化	37
3.3.5 重组蛋白的免疫原性和反应原性分析	38
3.3.6 重组蛋白鼠多克隆抗体效价检测结果	39
3.4 讨论	40
3.5 小结	40
第四章 间接 ELISA 方法的建立	41
4.1 材料	41
4.1.1 主要试剂	41
4.1.2 主要仪器	41

41
42
42
42
43
43
43
43
43
44
44
44
44
44
45
45
46
46
47
47
47
48
49
50
51
52

第一章 绪论

1.1 非洲猪瘟概述

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是一种以高热、出血为特征的高接触性传染性疾病^{III}。ASFV 能感染各年龄段的家猪和野猪,动物感染后由于毒株的毒力大小、动物的年龄以及个体免疫力的不同导致临床症状表现不一样。ASFV 按毒株的毒力强弱可分为 3 种:强毒力毒株、中等毒力毒株以及弱毒力毒株,临床症状可分为:最急性型、急性型、亚急性型和慢性型^[2,3]。

最急性型感染症状包括: 高热、急性猝死, 死亡率可达 100%^[4,5]。急性型是最常见的 ASFV 疾病形式, 感染症状表现为: 体温 41~42 ℃, 食欲下降, 呼吸急促、困难, 怀孕母猪流产或早产, 耳尖、尾端及四肢等末端的皮肤发绀, 可观察到大面积的皮下出血, 共济失调, 较长病程的个体会出现一些其它神经症状等^[6]。亚急性型与急性型的表现相类似, 症状稍轻, 病程变长, 死亡率有所下降, 全身器官出血和水肿是亚急性 ASF 主要的临床表现, 出血和水肿相较于急性型更严重, 这可能与 ASFV 感染后导致白细胞减少和血小板减少有关系^[7,8]。慢性型临床特征不明显, 一般是弱毒株引起的, 主要表现为发育迟缓, 精神沉郁, 呼吸困难, 皮肤坏死, 慢性型家猪的血液中长期携

1.1.1 非洲猪瘟流行病学和传播特征

ASF 首次在肯尼亚被发现,随后蔓延到非洲多个国家和地区,刚开始只在非洲大陆内流行^[11]。基于 ASFV 的主要结构蛋白 P72 表面抗原 C 末端序列(498-635)的不同,将其分为 24 种基因型,现流行于非洲南部的主要是 ASFV 基因 I 型^[12, 13]。直到 20 世纪五十年代,ASFV 的基因 I 型首次跨大洲传播,从非洲传入欧洲的葡萄牙,随后相当一部分欧洲国家采用扑杀和封锁疫区等严格防控措施来控制疫情,其中包括猎杀野猪和扑杀感染猪等综合措施^[14]。1971 年,伊比利亚半岛的病毒又传播到了南美洲等地区^[15]。自此 ASF 疫情在全球多地暴发,欧洲多国利用掩埋尸体、封锁疫区等方式控制疫情,这期间损失惨重,但成功根除了 ASF^[9]。此后,全球各地一段时间内未发生大规模的传播。直至 2007 年,东欧的格鲁吉亚地区的首例 ASF 被报道,可能与猪误食船上的污染物有关^[16]。紧接着从黑海港口传播到俄罗斯联邦和东欧;2018~2020年期间,欧洲多国地区发生了新的 ASF 疫情,这期间传入中国的毒株是与俄罗斯和欧洲相近的基因型 II^[15]。

野猪和家猪是 ASFV 的易感动物,非洲疣猪、丛林猪以及蜱均为 ASFV 的宿主, 感染后不发病,不表现明显的临床症状,但可以长期携带病毒,将病毒传播给易感动 物^[17,18]。ASFV 的循环传播方式主要分为四类:野外栖息地循环传播、蜱-猪间循环传 播、家猪间循环传播和野猪-栖息地循环。野外栖息地循环传播主要发生于非洲地区,

涉及洞穴的幼年非洲疣猪与非洲钝蜱,二者均属于 ASFV 的自然宿主,非洲钝蜱常栖息于疣猪洞穴中,通过叮咬向幼年的疣猪传播 ASFV,幼年的疣猪一方面表现高病毒血症,另一方面向未携带 ASFV 的非洲钝蜱传播病毒,带毒的蜱虫可以保持 ASFV 感染长达 15 个月,因此病毒在幼年非洲疣猪-非洲钝蜱之间实现长期稳定的循环^[17, 19]。 蜱-猪间循环传播的主要参与对象是非洲和欧洲的钝蜱和猪,成年疣猪被感染后终身带毒,成年疣猪的活动扩大了病毒和带毒蜱的传播范围,为蜱-猪循环提供有利条件,当地 ASF 的持续复发与病毒在钝蜱和家猪之间传播循环有很大关系^[17, 20-22]。家猪间循环, 是 ASF 最常见、最主要的传播方式,涉及生猪肉、加工猪肉、饲料、泔水、粪便、尸体等猪相关物品。野猪-栖息地间循环主要发生在欧洲,野猪之间通过直接接触传播, 也可通过间接的方式,如接触带毒的动物尸体传播^[23]。

1.2 非洲猪瘟病毒概述

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)的特殊性在于,它属于单独 分类科和属,是核质大 DNA 病毒(Nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDVs) 中唯一的 DNA 虫媒病毒,蜱类是 ASFV 的中间宿主^[24]。ASFV 病毒粒子的直径约为 200~300 纳米,呈现多层结构的正二十面体形态^[25, 26]。病毒粒子从内到外的结构依 次是:核酸 DNA 层(Nucloid)、核衣壳层(Core shell)、内膜层(Inner capsule membrane)、衣壳层(Capsid)、囊膜层(Outer membrane)^[25, 27]。ASFV 基因组 是线性的双链 DNA 分子,两端共价闭合,长度大约是 170 kb~190 kb,含有 150~170 个开放阅读框,可编码 150~200 多种蛋白质^[28-30]。基因组可分为左侧可变区(LVR), 约为 38~48 kb,中央保守区(C区),约 125 kb 以及大小为 13~22 kb 的右侧可变 区(RVR)^[31,32]。位于 LAR 内的多基因家族(mltigene family, MGF)、位于 C 区 内的中央可变区(CVR)以及 EP402R 基因的位置,由于毒株不同,可能会存在显 著差异^[32]。

单核细胞和巨噬细胞是 ASFV 感染的主要靶细胞,但 ASFV 感染宿主细胞的分子机制尚不完全清楚,细胞膜受体和参与入侵过程的病毒蛋白仍是未知的^[33]。早期的研究证明巨噬细胞表面蛋白 CD163 是 ASFV 入侵的重要受体,其单克隆抗体能阻断病毒感染^[34]。但是缺失 CD163 基因的猪在感染 Georgia 2007/1 后,与野生型猪相比,在临床表现、死亡率等方面并无明显差异,表明还存在其他关键受体或入侵机制^[35]。已经证明 ASFV 主要通过网格蛋白介导的内吞途径和非受体介导的巨胞饮途径入侵宿主细胞,在细胞质内的病毒工厂复制^[36,37]。病毒的复制短暂地发生在细胞核中,随后在核周区域的病毒工厂中合成 DNA^[38]。而病毒的基因表达分为即刻早期、早期、中期和晚期四个阶段^[39]。另外,ASFV 还进行转录后修饰和翻译后修饰,这些过程有利于细胞内 ASFV 基因组表达从而促进病毒复制,例如 ASFV 蛋白 NP868R 具有参与 mRNA 加帽的鸟苷酸转移酶(GTase)活性,参与催化 mRNA 帽

子结构的甲基转移过程^[40]。利用苯丁酸钠破坏病毒诱导的组蛋白 H3K9/K14 乙酰化 状态后,减弱了 ASFV 的复制^[41]。合成的病毒蛋白在核周区域的病毒工厂附近组装, 子代病毒在微管和驱动蛋白的作用下被运送到细胞膜, 完成出芽并释放^[42]。

1.3 ASFV 主要蛋白研究

1.3.1 外囊膜层

在完成出芽的病毒粒子外囊膜层检测到唯一的糖蛋白 pEP402R(CD2v),大小约为 89 kDa^[30]。研究认为 CD2v 在细胞中存在多种形式,分别是全长的糖基化蛋白以及 经蛋白水解作用所产生的大小为 63 kDa 和 26 kDa 的多肽片段^[43]。CD2v 蛋白促进红 细胞吸附于受病毒感染的细胞表面,与其相邻的基因 EP153R 也有相同的功能^[44,45]。

1.3.2 衣壳层

病毒的衣壳呈二十面体结构,与外囊膜相邻,可保护病毒免受环境中理化因素的 影响。构成衣壳的主要蛋白有:p72、pM1249L、p17、p49(B438L)以及 pH240R, 其中 p72 占病毒粒子总质量的 31%~33%^[25,30,46]。p72 在病毒感染后诱导抗体反应,由 于其保守性和免疫原性,它被广泛用作 ASFV 感染的抗体检测靶标^[47,48]。病毒衣壳由 2760 个伪六聚体和 12 个五聚体构成,其中每 3 个 p72 蛋白分子形成一个伪六聚体衣 壳,再加上 5 个五聚体蛋白组成了五聚体衣壳,而 pB438L 蛋白形成了衣壳的顶点^[25]。



图 1-1 ASFV 衣壳结构^[31]。

Figure 1-1 The ASFV capsid structure.

1.3.3 内膜层

病毒的内膜是病毒从内质网(ER)出芽得到的,通过免疫电子显微镜在内膜中发现了 p17、pE183L、p12、pE248R 和 pH108R^[49]。其中 pE183R 是参与内膜形成的关键蛋白;而 p12、pE248R 和 pE199L 参与病毒入侵过程;pE248R 和 pE199L 参与了病毒粒子的组装过程^[30]。有研究认为,尽管免疫电子显微镜分析显示 p12 定位于病毒的内膜上,但它的功能与促进病毒吸附有关^[50]。

1.3.4 核衣壳层

病毒结构的第四层是核衣壳层,直径大约为180纳米。在病毒蛋白酶(pS273R)的作用下,分解病毒的多聚蛋白前体 pp220 和 pp62,形成成熟的产物组成核衣壳层。pp220 的分解产物包括: p14、p150、p34、p37 和 p5;而 pp62 的分解产物包括 p35、p15 和 p8^[30,49]。

1.3.5 核酸 DNA 层

核酸 DNA 层位于病毒粒子的最内部。ASFV 的基因组的末端由共价交联的发夹环 组成^[49]。p10 和 pA104R 是位于该层的 DNA 结合蛋白^[30]。





Figure 1-2 Schematic diagram of African swine fever virus (ASFV) protein distribution.

1.3.6 抑制 I 型干扰素信号通路和 NF-κB 信号通路

MGF360、530/505 等多基因家族的蛋白能够抑制 I 型干扰素的产生,从而抑制其 发挥抗病毒效应^[52-56]。

DP96R(UK)是ASFV的毒力基因,病毒基因组的右侧可变区,分子量约为10.7 kDa。研究表明,ASFV E70菌株中缺失 DP96R 基因(ΔUK)后,病毒在体外复制没有变化,但在感染猪中表现为毒力降低^[57]。有趣的是,最近的一项研究表明,对Georgia 2007/1进行9GL(B119L)和UK(DP96R)双基因缺失后得到(ASFV-G-Δ9GL/ΔUK),

不仅减弱了病毒的复制能力,还降低了致病性^[58]。ASFV 能够激活和调节 cGAS-STING 信号通路^[59]。pDP96R 阻断 TBK1 和 IKKβ 的激活影响 NF-κB 信号传导,从而负向调 节 cGAS STING 信号通路,抑制 I 型干扰素的产生^[60]。这些数据表明,pDP96R 在 ASFV 免疫逃逸中起着重要作用。

pI215L是ASFV的一种早期表达的蛋白质,定位于病毒工厂和细胞核中^[61]。pI215L 是目前已知的唯一一种由病毒编码的 E2 泛素结合酶,可以泛素化某些 ASFV 蛋白以 诱导限制性蛋白水解,如 PIG1^[62-64]。pI215L 与 40S 核糖体蛋白 RPS23、翻译起始因 子 eIF4E 和 E3 泛素连接酶 Cullin 4B 相互作用,改变了 mTOR 信号通路并影响宿主翻 译机制^[65]。pI215L 减弱了 TBK1 的 K63 连接的多泛素化,同时,pI215L 与 E3 泛素连 接酶 RNF138 相互作用,增强 RNF138 与另一种 E3 泛素连接酶 RNF128 之间的相互作 用,导致 RNF128 降解并降低 TBK1 的 K63 连接多泛素化^[66]。另一项研究表明,pI215L 与 IRF9 相互作用并促进其降解从而抑制干扰素刺激的反应元件(ISRE)的活性和干 扰素刺激基因(ISGs)的转录,但这种作用不依赖 pI215L 的 E2 酶活性^[67]。

pI329L 是 ASFV 的晚期蛋白,共有 329 个氨基酸,是一种高度糖基化的蛋白质, 分布在受感染细胞的细胞膜上,pI329L 的胞外域包含与蛋白质相互作用有关的重要基 序:四个富含亮氨酸的重复序列(LRR)^[68]。这种重复序列存在于多种 TLR 中,pI329L 可能与 TLR 的下游信号分子竞争性结合,从而影响干扰素的产生^[69]。

pE120R 是位于病毒的衣壳层,它在不同的 ASFV 株系中高度保守,含有约 120 个氨基酸^[70]。研究显示,pE120R 对于微管介导的病毒粒子在细胞内的运输至关重要 ^[70]。此外,pE120R 通过与 IRF3 CTD 结构域相互作用,抑制 cGAS-STING 通路的 IFN-β 的产生,并抑制了 ASFV 的复制^[70]。

pF317L 蛋白由 317 个氨基酸组成, pF317L 抑制 TNFα 和 poly(dA:dT)诱导的促炎 细胞因子表达和 NF-κB 启动子活化,进一步的研究证明, pF317L 与 IκB 激酶 β(IKKβ) 相互作用并抑制其磷酸化,增强 IκBα 的稳定性,阻断 NF-κB 活化的同时抑制 p65 核 易位^[71]。

半胱天冬蛋白 pM1249L 定位于病毒的衣壳层,是一种由 1249 个氨基酸组成的晚期表达蛋白^[39]。与其他衣壳蛋白形成分子间网络,促进衣壳框架的形成并决定衣壳的 大小^[25]。同时,pM1249L 可以通过抑制 TBK1 的磷酸化和介导溶酶体途径降解 IRF3 来拮抗 IFN-β 信号通路^[72]。

1.3.7 与细胞凋亡相关的 ASFV 蛋白

pA224L,是凋亡抑制蛋白家族(IAPs)的同源蛋白,在ASFV 感染晚期表达,含有224个氨基酸,在不同的ASFV 菌株中相对保守,具有90%~99%的氨基酸同一性^[73]。研究表明,pA224L 的过表达显著干扰了由 TNFα、环己酰亚胺或星孢菌素诱导的 Vero 细胞凋亡。此外,pA224L 能够与活化后的 caspase-3 相互作用,缺少 A224L 基因的ASFV 缺失突变体显示出更强的诱导凋亡的能力^[74]。

pA179L 分子量为 21 kDa, 含有 179 个氨基酸, 由于有 BH1、BH2、BH3 和 BH4

的保守结构域,被认为是 Bcl-2 家族成员的同源物^[73]。Galindo 等人的研究表明,pA179L 直接与仅表达 BH3 截短体的活性蛋白质发生相互作用,如 Bax 和 Bak,从而阻止细胞 进入凋亡程序^[75,76]。除了凋亡,还能抑制饥饿条件下诱导的细胞自噬,BH3 结构域是 pA179L 与自噬相关蛋白 Beclin-1 相互作用的关键区域^[77]。

pDP71L 由 DP71L 基因编码,是 ASFV 中高度保守的晚期蛋白。研究表明,pDP71L 与真核翻译起始因子 eIF2α 相互作用,然后通过招募 I 型蛋白磷酸酶 PP1α 去磷酸化 eIF2α,从而促进翻译并抑制 eIF2α-ATF4-CHOP 凋亡途径^[78]。pDP71L 是某些 ASFV 菌株毒力所必需的,在 E70 和 Georgia 2007 株中缺失 DP71L 基因后降低了病毒毒力,而马拉维 Lil20/1 和 Pretorius kop/96/4 菌株的相同缺失仅略微降低了毒力^[79-81]。

在亲本 BA71V 株中删除 EP153R, ΔEP153R 株激活更多的 caspase-3 并诱导了细胞凋亡,这提示 pEP153R 能够抑制细胞凋亡^[82]。作为一种多功能的病毒蛋白, pEP153R 通过抑制 MHC-I 的分泌过程,抑制 MHC-I 在细胞膜上的表达^[82]。

1.4 ASFV 检测方法研究进展

仅通过临床特征和尸体剖检进行诊断,很难对 ASF 进行区分,容易与其他猪出血性疾病混淆,包括经典猪瘟(CSF)、高致病性猪繁殖和呼吸综合征(HP-PRRS)和猪丹毒。因此,实验室检测对于 ASF 的诊断至关重要。目前检测 ASFV 的方法主要有两大类:病原学检测和血清学检测。

1.4.1 病原学检测

1.4.1.1 病毒分离和血液吸附(HAD)试验

ASFV 主要从扁桃体或淋巴结的单核-吞噬细胞中传播至肝脏和肾脏^[83,84]。因此病 毒分离主要从感染猪的血液、脾脏、肝脏等器官中进行,以进行进一步的实验室诊断 ^[85]。另一方面,为避免因病毒的浓度和质量降低影响诊断的准确性,需要在易感细胞 中复制病毒,经过分离并培养病毒后,进行 HAD 试验。

HAD 试验的原理是红细胞附着在受感染的细胞上,产生了玫瑰花样变化^[86]。HAD 试验通常用于常规样品检测。不足之处在于获得结果的时间长,并且需要定期制备新鲜的原代细胞。此外,有报道称一些 ASFV 分离株不会产生血液吸附效应,导致 HAD 出现假阴性的结果^[87-89]。

1.4.1.2 聚合酶链反应(PCR)

常规 PCR 是 OIE 推荐的 ASFV 核酸检测方法之一,通常用于检测血清、血液或 器官样本中的 ASFV 基因。该方法具有简单、快捷、灵敏、特异和对样品纯度要求低 的优点。Aguëro 等人针对 7 种不同 ASFV 毒株的 VP73 基因(VP72 基因的一部分) 核苷酸序列,设计特异性引物,建立了一种新的 PCR 检测方法,它灵敏度高,适用 范围广^[90]。OIE 在《陆地动物诊断测试和疫苗手册》(2012 年)中推荐了这种方法并 将其作为诊断标准。基于 ASFV 中间宿主蜱类的研究,建立了一种巢式 PCR 检测方法,以检测野生蜱(Ornithodoros 物种)中的 ASFV^[91]。Erickson 等人建立了一种同时检测

猪的七种病毒的新方法,展现了高效率和高通量检测的特点^[92]。除此之外,基于 Bio-Plex 悬浮阵列系统,建立了多重 PCR 检测方法,对包括 ASFV 在内的七种病原体 进行检测^[93]。具体过程为:首先进行多重 PCR 扩增,然后将扩增产物与流动珠上的特 定探针进行偶联。最后,使用 Bio-Plex 系统进行检测。Bio-Plex 系统可以同时进行大 量的样品检测,真正实现了高通量和快速检测,缺点是仪器成本昂贵。

PCR 灵敏性好、特异性强。然而, PCR 检测过程中样品易发生交叉污染,出现假 阳性结果,再加上提取核酸过程中某些试剂可能会破坏原有的核酸结构,因此也不能 排除假阴性的 PCR 结果^[94]。

1.4.1.3 实时荧光 PCR

实时荧光 PCR 通过寡聚核苷酸探针的荧光信号识别目标序列,实时检测基因扩 增。实时荧光 PCR 是最灵敏和最可靠的检测方法,是 ASFV 检测的金标准。2003 年 首次报告了检测 ASFV 的实时 PCR 方法,研究人员设计了 ASFV 基因 VP72 的扩增引 物,并通过 50 核酸酶分析系统检测 PCR 扩增子^[95]。为了防止核酸抑制剂影响检测结 果,提高检测的准确性,另一个研究利用内源性 β-肌动蛋白作为内参对照,提高了灵 敏度并降低了假阴性率^[96]。Fernández 等人使用内源性 β-肌动蛋白的商业通用探针文 库(UPL)作对照,进行 PCR 检测并用内参标准化,将 UPL 探针与引物组结合,以 扩增 VP72 编码基因^[97]。这种实时荧光定量 PCR 技术,通过标准化的商业探针,所建 立的方法简单,花费的时间少且成本低。近年来,有相关报道提出了一种基于生物传 感器的检测猪血液中 ASFV 的方法^[98]。该方法使用带有单链 DNA 探针的锁定核酸 (LNA)作为基因 VP72 的互补识别元件,快速定量 ASFV 核酸以达到检测目的。在 PCR 检测中结合生物传感器,具有实时和无标记检测的优势,但由于血液中的某些物 质可能会与传感器表面发生特异性反应,必须先提取血液中的 DNA 才能进行检测^[98]。 1.4.1.4 重组酶聚合酶扩增(RPA)、环介导等温扩增(LAMP)和交叉启动扩增(CPA)

等温扩增法消除了 DNA 扩增对热循环设备的依赖,更适应非实验室环境下的检测^[99]。常见等温技术包括:如重组酶聚合酶扩增(RPA)、环介导等温扩增(LAMP)和交叉启动扩增(CPA)。

RP A 适用于所有 ASFV 的基因型,与其他病原体无交叉反应^[100]。英国 T wistDx 公司首先开发了重组酶聚合酶扩增法(RPA)^[101]。重组酶首先与引物形成复合物。该 复合物与双链 DNA 发生链交换反应,形成 D 环结构,单链 DNA 结合蛋白(SSB)结合到 DNA 链上,实现目的基因扩增^[102]。Wang 等人基于 RPA 建立了一种快速、特异 的 ASFV 检测方法。使用 T wistAmp exo 试剂盒(T wistDX,英国剑桥)进行 RPA 反 应,并在扫描设备上运行出检测结果^[103]。

环介导等温扩增(LAMP)是日本科学家设计的一种新型的核酸快速扩增技术,可以在 60~65 ℃下扩增,大约需要 15~60 min^[104]。James 等人建立了针对 ASFV 拓扑 异构酶 II 基因的检测方法,该结果表明可以灵敏而准确地检测到 LAMP 扩增子^[105]。 为了使检测方法更高效方便。Tran 等人通过可视的变化来表示实验结果,建立了实时

LAMP 测定和视觉 LAMP 测定,直接从血清样本中检测 ASFV^[106]。Zhu 等人将蜂巢芯 片与直接 LAMP 分析相结合,建立了一个多样化的视觉检测平台^[107]。然而当发生气 溶胶污染时,该方法容易出现较高的假阳性率^[108]。因此,LAMP 检测技术具有良好的 发展前景,但仍具有改进的空间。

交叉启动扩增(CPA)是 Ustar 等研发的一种通过链置换来扩增目的基因的等温扩 增技术,通过设计 4~5 对引物,于 63 ℃下实现基因扩增^[109]。除检测病毒外,CAP 检 测方法还可以分类肉的品种^[110]。Fraczyk 等人通过检测 86 个动物血清样本,首次报道 了检测猪和野猪血液和血清的交叉引物扩增(CPA)试验^[111]。

1.4.2 血清学检测

血清学诊断方法最常见,同时具有操作简单、成本低的优势。当猪感染弱毒或低 毒力毒株时,核酸检测无法检测到病毒,这时候血清学检测是不二之选。目前没有针 对 ASFV 获批上市的疫苗,ASFV 抗体存在即表明发生感染。因此,抗体检测对于 ASF 的诊断很重要。

1.3.1.1 间接 ELISA

免疫渗透电泳(IEOP)在检测 ASFV 抗体方面有一定的优势,但需要从 ASFV 感染的 VERO 细胞中提取抗原,不适应大规模调查检测^[112]。ELISA 弥补了这些缺点,因此取代了 IEOP 成为最常用的大批量血清 ASFV 检测方法^[113]。

Tabares 等用半纯化的 VP73 蛋白作为包被抗原,提前了 2 天检测到 ASFV 抗体, 很大程度上提高了检测的准确性^[114]。用家猪多克隆抗体血清对文库进行筛选,发现 p30 和 p54 在感染时具有较高的抗原性^[115, 116]。Oviedo 等通过杆状病毒表达重组蛋白 p30 和 p54,结果表明 p54 更适用于 IBT^[116]。Filgueira 等人利用杆状病毒载体在昆虫 表达系统中表达 p30,在感染早期检测中体现了优势^[117]。另一个研究表示,p54 和 p30 蛋白串联表达,可提高血清学诊断的敏感性^[116]。

Gallardo 等开发基于 pp62 蛋白的 ELISA 检测方法, 在样品保存较差时, 检测精确 度明显提高^[118]。Gallardo 等人评价了重组蛋白 A104R、B602L、p54 和 K205R 作为抗 原的 ELISA 检测方法的效果, 其中, 来自东非的血清样本敏感性低, 但特异性却很高, 很, 在检测来自欧洲和西非家猪和疣猪的血清样本时显示了良好的灵敏性和特异性 ^[119]。

1.3.1.2 间接荧光抗体检测

间接荧光抗体检测(Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)是利用具有细胞适应性的 ASFV 感染单层 VERO 细胞, 然后将荧光素偶联到特定的抗原-抗体反应中, 通过在显微镜观察到感染细胞的细胞质中发出特异性荧光,实现对 ASFV 抗体的检测, 适用于感染早期检测血清、血浆或组织分泌物中的抗体^[120, 121]。但由于被检测的血清 含有针对细胞本身蛋白的抗体, 因此未受感染的细胞也有可能发出荧光, 导致解释结果时产生错误的判断。

1.3.1.3 免疫印迹试验

免疫印迹(Immunoblotting, IBT)的灵敏度优于 IFA。Pastor 等用猪血清进行免疫印迹实验,观察到条带反应^[120]。Kazakova 等人构建带有 6x His 标签的 ASFV p30 的表达质粒,利用高纯度的重组蛋白 p30 建立用于诊断 ASFV 的免疫印迹试验(IBT)方法,特异性和敏感性均有所升高^[122]。

1.5 ASFV 疫苗研究进展

1.5.1 灭活疫苗

利用物理或化学的方式将病毒灭活是一种最基本、最普遍的疫苗生产方法,操作 起来相对简单,病毒的灭活意味着病毒毒力不会返强,不存在传播的风险,因此灭活 疫苗具有更高的安全性。然而,灭活疫苗并不一定能提供保护效果。早期的研究使用 传统方法尝试用各种灭活的 ASF 免疫猪,尽管在某些情况下能够诱导抗体产生,但最 终没有提供足够完全的保护效果^[123,124]。这大概是由于细胞免疫对 ASFV 保护至关重 要,但在原发性感染中很难实现有效的病毒中和^[125]。

1.5.2 减毒活疫苗(LAVs)

获得 ASF 减毒活疫苗(LAVs)主要有三种主要策略:细胞传代致弱、筛选天然 弱毒株及删除毒力相关基因。LAVs 可以在宿主内复制,模拟了自然感染状态下触发的 体液免疫途径和细胞免疫途径,并且不需要佐剂来增强免疫反应的强度。但是在少数 情况下,LAVs 可能重新具有致病性,导致病毒传播,引起相关的副作用。基因 I 型 ASFV 在猪骨髓和肾细胞中持续传代致弱,用减毒毒株免疫的猪对亲本毒株能够提供 保护作用,然而,西班牙和葡萄牙后续田间试验中免疫后的动物患上了慢性 ASF,造 成灾难性的后果^[126,127]。流行于欧洲的基因 II 型 Stavropol 01/08 毒株在猪淋巴细胞杂 交细胞系 A4C2/9k 和非洲绿猴肾细胞系 CV-1 中传代^[128]。由此产生的病毒失去了致病 性,但它们未能保护猪免受攻击。另一项研究表明,CV-1 细胞系传代获得弱毒毒株 e755cv1 对同源 E75 病毒具有保护作用,对异种 BA71 病毒的交叉保护作用较差^[129]。

天然弱毒株包括非血吸附型(Non-HAD)毒株和其他自然发生的毒力降低的菌株。 例如,在伊比利亚半岛从慢性感染的猪和软蜱中分离出的 Non-HAD 毒株 NH/P68 和 OURT88/3^[130,131]。以及从拉脱维亚野猪中分离的基因型 II 株 Lv17/WB/ Rie1^[132]。尽管 这些自然减毒毒株有可能发展为 LAVs,但是仍存在残余毒性和传播风险方面的顾虑, 因此可以尝试在自然减毒株中进一步删除与毒力相关的基因,以提高自然减毒菌株的 安全性。Ramirez 等构建了 E184L 缺失的减毒株,能够区分接种动物(DIVA)和感染 动物,但缺失 E184L 的减毒株不能提供完全保护^[133]。因此研究开发 LAVs,一方面 要充分保证有效性和安全性,另一方面要考虑疫苗和野生毒株感染的差异性和特征性, 来区分接种动物(DIVA)和感染动物。

删除毒力相关基因是通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术或同源重组技术,合理删除 毒力相关基因或参与逃避宿主免疫应答的基因,达到降低病毒毒力的作用。目前为止

已主要靶向删除的基因包括:血凝素 CD2v/EP402R、胸苷激酶 TK/K169R、以及 ASFV 不同强毒株的毒力相关基因,包括 9GL/B119L、UK/DP96R、I177L、I226R、A137R 和 E184L^[58, 133-138]。然而,删除这些基因有时候不能产生预期的结果。例如,基因 I 型 BA71 分离株中删除 CD2v/EP402R(8DR)基因能够致弱病毒,并且产生的 BA71ΔCD2 菌株对同源和异源强毒病毒的攻击均具有保护作用^[129, 139]。然而,Georgia 2010 株的类似缺失: ASFV-G-Δ8DR(ASFV-G-CD2v/EP402R)并未能显著改变病毒的 毒力,而且发生了与亲代毒株诱导的临床症状相似的病症^[140]。其他毒力基因的缺失也 得到了类似的结果,如 TK/K169 和 NL/DP71L^[141-143]。此外,因毒力基因缺失而产生 的 LAVs ,如果复制水平大大减弱或所表达的免疫原性基因数量降低,那么产生的保 护效果也会大打折扣。例如:疫苗株 ASFV-G-Δ9GL/ΔCD2v、ASFV-GΔ9GL/ΔMGF 和 ASFV-GΔ9GL-ΔNL/ΔUK、就是如此^[80, 140, 144]。因此在疫苗研究开发中,平衡好减毒活 疫苗的安全性和有效性是研究人员面临的重要课题。

Chen 等人构建的七个基因缺失的多基因缺失减毒株 HLJ/18-7GD,验证了妊娠母 猪给药的安全性并提供了长达十周的免疫保护^[145]。另一项研究,Borca 等人在高毒力 ASFV Georgia 2007/1 (ASFV-G)的基因组中删除 I177L 基因,得到了 ASFV-G-ΔI177L 株,它可以通过肌肉注射和口鼻途径给药,诱导强大的免疫反应,以对抗亲本 ASFV Georgia 2007/1 的攻击^[146]。并在针对越南强毒株 TTKN/ASFV/DN/2019 的试验中也证 明有效^[136,147]。

1.5.3 亚单位疫苗、DNA 疫苗和病毒载体疫苗

亚单位疫苗是使用纯化的重组蛋白或合成编码特定病毒表位的多肽,配合佐剂诱导保护性免疫反应的一种疫苗方法,因此关键在于筛选出能够提供保护性作用的抗原或者抗原表位。结构蛋白 p54、p30、p72 和血凝素 CD2v 是具有保护性的抗原,这些蛋白质是亚单位和 DNA 疫苗策略的主要靶点。使用杆状病毒分别表达重组蛋白 p54和 p30,提供了不同程度的保护,有的延迟了发病时间,有的获得完全保护^[148]。在同一系统中表达的嵌合 p54/p30 也取得了一定效果,免疫猪在强毒的攻击下存活并产生了中和抗体^[149]。然而,在另一项研究中,杆状病毒表达嵌合的 p54、p30 和 p72 未能诱导有效性保护^[150]。杆状病毒表达的 CD2v 也在一定程度上显示出对强毒攻击的保护,但这种保护没有产生中和抗体^[151]。将 p54/p30 与猪白细胞抗原 II(pCMV-APCH1PQ)特异性抗体的单链可变片段融合在一起免疫猪,检测到针对 ASFV 的特异性 T 细胞,但没有起到有效的保护作用^[152]。然而,将泛素与三种 ASFV 决定簇(sHA,p54 和 p30)融合表达,诱导了强烈的 CD8+ T 细胞反应,尽管缺乏特异性抗体但仍然提供了部分保护作用^[153]。

DNA 和病毒载体疫苗相比灭活疫苗有一个优势:它们能够诱导细胞免疫反应,而葡萄牙 OUR/T88/1 分离株已经证实,CD8+T 淋巴细胞在 ASFV 保护性免疫中起到重要作用^[154]。病毒载体疫苗能够主动穿透宿主细胞并再细胞内复制,还能够以载体编码的免疫原作为疫苗标志物区分受感染动物(DIVA)。最近的研究表明,由腺病毒、甲

病毒和牛痘病毒作为载体,47种不同 ASFV 基因作为抗原的鸡尾酒法能够诱导强烈的 特异性细胞反应^[155-158]。使用腺病毒作为载体联合 B602L、p72、p30、p54、E199L、 EP153R、F317L、MGF505-5R 基因对猪进行初次免疫,后克隆到安卡拉牛痘病毒载体 作为增强免疫时,在 OUR T88/1 毒株攻击后实现了 100%的保护^[159]。

亚单位疫苗、DNA 疫苗和病毒载体疫苗有广阔的发展前景,一些候选疫苗已被证 明能诱导特定的体液免疫反应或细胞免疫反应,具有部分或完全的保护作用。然而, 这些研究中使用的免疫方案的不同性质,包括疫苗接种策略和毒株类型,难以进行相 互之间的效果比较,需要进一步的研究工作来开发、评估安全合适的疫苗。

1.6 研究目的及意义

1.6.1 研究目的

1、研究 pI226R 逃逸天然免疫的具体功能。

2、利用原核表达系统表达 ASFV I226R 蛋白,并经过纯化得到高纯度的蛋白。

3、利用所得的重组蛋白作为包被抗原,建立并优化检测抗体的间接 ELISA 方法。 1.6.2 研究意义

1、I226R 是 ASFV 的一个重要毒力基因, 删除 I226R 基因后的毒株与亲本相比毒力明显减弱^[137]。在机制方面, pI226R 对调控 cGAS-STING 通路的具体影响机制尚不明确。探究 ASFV I226R 调控 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素分泌的分子机制,为开发单基因缺失减毒疫苗或多基因缺失减毒疫苗奠定理论基础。

2、当感染弱毒或低毒力 ASFV 时,核酸检测无法检测到抗原,这时候血清学检测 就成为了不二之选。由于目前没有针对 ASFV 获批上市的疫苗,在动物血清中检测到 ASFV 抗体存在意味着发生了病毒感染。ASFV 的血清学检测方法为监测疫情,进行 早期预防工作提供数据支撑。因此,基于抗体检测建立的 ELISA 方法对于 ASF 的诊 断至关重要。所建立的方法也为区分疫苗接种动物(DIVA)和病毒感染动物打下基础。

第二章 非洲猪瘟 I226R 蛋白功能研究

ASFV 的基因组庞大,是线性的双链 DNA 分子,两端呈现共价闭合,长度大约是 170 kb~190 kb,含有 150~167 个开放阅读框,可编码 150~200 多种蛋白质 ^[28-30]。然而在 ASFV 编码的众多蛋白中,仍有大部分蛋白的功能是未知的,而认识蛋白功能对开发安全有效的 ASF 疫苗至关重要。

病毒和宿主之间的相互作用体现在:一方面,宿主进化过程中形成的固有免疫系 统是抵御病原入侵的第一道防线,发挥着先天免疫反应的防御功能^[160]。不同类型的干 扰素(IFN)虽然在结构、受体和生物活性等方面有很大差异,但都可以起到抵抗病 毒侵袭的作用,I型 IFN 通过干扰病毒的生命周期来限制病毒的复制和传播^[161]。ASFV 感染单核细胞和巨噬细胞后,首先诱导宿主的先天免疫反应,其次产生适应性免疫反 应。ASFV 是 DNA 病毒,病毒的双链 DNA 分子可以被 cGAS(DNA 的一种模式识别 受体(PRRs))识别为病原体相关分子模式(PAMP),然后通过 cGAS-STING 信号 通路激活 I型干扰素(IFN)的表达,并激活下游干扰素刺激基因(ISG)的转录来抵 抗 ASFV 感染^[162]。另一方面病毒为了生存和繁衍,编码各种逃避宿主免疫反应的蛋白。 与宿主共同进化的过程中,病毒演化出一些干扰 IFN 级联信号系统的策略,以确保其 感染和复制顺利进行,已有研究表明 ASFV 的强毒株能够抑制感染细胞中干扰素 IFN 和干扰素刺激基因 ISG 的表达^[59,163]。

由于 pI226R 抑制 cGAS-STING 通路的具体机制尚不明确。本章节的研究旨在探 究 pI226R 调控 cGAS-STING 信号通路的分子机制,对 ASFV 的免疫逃逸机制作进一步补充,以期为基因缺失减毒疫苗的研发奠定理论基础。

2.1 材料

2.1.1 质粒和细胞

pIFN-β-Luc、pRL-TK、Flag-cGAS、 Myc-STING 、Myc-TBK1、Flag-IRF3 和 HA-I226R 表达质粒以及人胚胎肾细胞 (HEK293T) 和猪肾细胞 (PK-15) 由本实验室 保存;

2.1.2 抗体和试剂盒

抗体: cGAS(E9G9G) Rabbit mAb、兔单抗 TBK1/NAK、phospho-TBK1/NAK (Ser172)、IRF3、phospho-IRF-3(Ser396)、小鼠抗 HA、Flag、Myc、Tubulin 和 GAPDH 单克隆抗体、Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 633 小鼠抗体以及 cGAS (E9G9G) 均购自 Cell Signaling Technology (CST)公司; HRP 标记的山羊抗鼠和山羊抗兔的二 抗均购自 Proteintech 公司;

试剂盒: 无内毒素质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 双荧光 素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega(美国)公司;反转录试剂盒(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)和荧光定量检测试剂盒(2×SYBR Green PCR Master Mix)均购自宝生物工程(大连)有限公司;

2.1.3 实验耗材

1.5 mL、2 mL 的离心管购买于北京索莱宝科技有限公司;无 DNA、RNA 酶型的 离心管购买自爱思进(axygen)生物技术(杭州)有限公司;细胞培养皿购买自 NEST 耐思生命科技(无锡)股份有限公司;15 mL 和 50 mL 离心管购买于莱恩生物科技有限公司。

214	其他	试剂
4.1.4	見じ	瓜汀门

	公司
Lipofectamine 2000 转染试剂	Thermo Scientific, 美国
MG132	Sigma,德国
CHX	Sigma,德国
胎牛血清	Gibco 公司,美国
细胞培养基	Gibco 公司,美国
Opti-mem 培养基	Gibco 公司,美国
牛血清白蛋白(BSA)	北京索莱宝科技有限公司
PVDF 膜	宝生物工程(大连)有限公司
dNTPs	宝生物工程(大连)有限公司
Oligo dT	宝生物工程(大连)有限公司
TB Green Premix Ex Taq II	宝生物工程(大连)有限公司
Western blotting 发光液	大连美伦生物技术有限公司
逆转录酶(M-MLV)	Promega 公司,美国
Recombinant RNase Inhibitor	Promega 公司, 美国
鱼日 Marker	北京康润城业生物科技公司(GenStar)
王要试剂配力:	
(1) PBST	1 L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.63 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
0.05% Tween-20	500 µL
(2) 5x SDS-PAGE Loading Buffer	(以 50 mL 为例)
SDS	5 g
溴酚蓝	0.25 g
1 M Tris-HCl (pH6.8)	12.5 mL
甘油	25 mL
β-巯基乙醇	2.50 mL

用去离子水充分混匀溶解,定容至5mL,分装后置于4℃保存备用。

(3) 20×TBST	5 L
NaCl	818 g
Tris	242 g
Tween 20	50 mL
HCl	148 mL,调节 PH 约为 7.2-7.4

定容至5L,使用时 ddH₂O 稀释为 1×TBST。

(4) DEPC 水的配制:将 100 mL 带盖玻璃瓶内装 60 mL 的 ddH₂O,按照 1:1000 加入 60 μL DEPC,置于 37 ℃充分溶解过夜,次日经高压蒸汽灭菌锅处理,冷却后方可使用。

(5)免疫印迹封闭液:用1×TBST稀释5%脱脂奶粉+1%BSA。

2.1.5 主要仪器

仪器	公司
细胞计数仪	Thermo Scientific,美国
Trizol 试剂	Thermo Scientific,美国
生物安全柜	Thermo Scientific,美国
高压蒸汽灭菌锅	力辰科技
金属浴	杭州博日科技有限公司
CO2细胞培养箱	Thermo Scientific, 美国
超纯水仪	Millipore,美国
全自动化学发光图像分析仪	BioRad 公司,美国
电子显微镜	日立高新技术株式会
多功能微孔板酶标仪	Tecan 公司,奥地利
7500 Real-time PCR	ABI 公司,美国

2.2 方法

2.2.1 双荧光素酶报告基因系统试验

具体方法1:

(1)将 PK-15 细胞用 PBS 洗两遍,胰酶消化后加入适量含 10% FBS 的培养基吹 打混匀,将细胞接种于 24 孔板内;

(2)待细胞汇合度达到 60%~80%左右,将海肾荧光素酶 pRL-TK (20 ng)、报告 基因质粒 pIFN-β-Luc (100 ng)、瞬时转染 Flag-cGAS (100 ng)、Myc-STING (100 ng)和 不同剂量的 HA-I226R(0, 100、200 和 300 ng)或空载体质粒至 PK-15 细胞中,转染 24 h 后用 1×细胞裂解液收集细胞(将试剂盒中的 10×细胞裂解液稀释十倍),置于 4 ℃ 垂直混匀仪裂解 30 min, 12000 rpm 离心 10 min,将上清转移至新的 1.5 mL EP 管中备 用。

具体方法 2:

(1)将 PK-15 细胞用 PBS 洗两遍, 胰酶消化后加入适量的含有 10% FBS 的培养 基吹打混匀后,将细胞接种于 24 孔板内;

(2)待细胞汇合度达到 60%~80%左右,瞬时转染海肾荧光素酶 pRL-TK (20 ng)、 报告基因质粒 pIFN-β-Luc (100 ng)和不同剂量的 HA-I226R(0, 100、200 和 300 ng)或 空载体共转染至 PK-15 细胞中,18 h 后转染 Poly(dA:dT) (2 μg),12 h 后用 1×的细胞裂 解液收集样品,置于 4 ℃垂直混匀仪裂解 30 min,12000 rpm 离心 10 min,将上清转 移至新的 1.5 mL EP 管中备用。

根据试剂盒说明书步骤,检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性:

步骤 1:用微量移液器取 20 μL 制备好的裂解物到新的 1.5 mL EP 管,加入预先配制的荧光素酶检测试剂 II (LAR II)中,吹打混合均匀后,用多功能微孔板酶标仪读取数值,记录。

步骤 2:加入 Stop & Glo®试剂,吹打混合均匀(与第一步的吹打时间一致)。用 多功能微孔板酶标仪读取数值,记录。DLR™检测总耗时 30 s。

2.2.2 免疫印迹分析

2.2.2.1 WB 检测 PK-15 细胞内的蛋白表达情况

(1)样品收集和处理:将 Flag-cGAS(100 ng)、HA-STING(100 ng)、HA-I226R(0、100、200和300 ng) 或空载体质粒利用脂质体法转染至 PK-15 细胞中 (12 孔板),24 h 后利用细胞裂解液收集样品,于4 ℃裂解 30 min 以上;加入 5× Loading buffer,98 ℃ 金属浴加热 10 min,之后离心 15 min 使细胞沉淀和上清分开。

(2)上样,进行 SDS-PAGE;转印至 PVDF 膜,加入新鲜配制的封闭液置于摇床 上室温封闭 60 min 以上;

(3)取2个15mL离心管,按照1:2000的比例用新鲜的封闭液(现配现用)稀释抗HA或抗Tubulin的单抗,孵育PVDF膜4℃过夜,TBST洗涤3次,每次8min;

(4)把封闭好的 PVDF 膜放入大小合适的孵育盒内,加入适当体积的一抗,以一 抗能够完全覆盖 PVDF 膜为宜; 孵育一抗4℃过夜,回收一抗放入-20℃保存。TBST 洗膜 3 次,每次 8 min;

(5)室温孵育 HRP 标记抗兔或抗鼠的二抗1h, TBST 洗涤3次,每次8 min, 置于 Western blot 成像仪拍照显影,保存图片。

2.2.2.2 WB 检测 293T 细胞内的 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平

(1)样品收集和处理:将 Flag-cGAS(1 μg)、HA-STING(1 μg)、HA-I226R(1.5 μg)
或空载体质粒转染至 HEK293T 细胞 (6 孔板), 24 h 后细胞裂解液收集样品,置于 4 ℃
垂直混匀仪裂解 30 min 以上,加入 5× Loading buffer; 98 ℃金属浴加热 10 min,离心
15 min 使细胞沉淀和上清分开;

(2)上样,进行 SDS-PAGE;转印至 PVDF 膜,加入新鲜配制的封闭液置于摇床 上室温封闭 60 min 以上;

(3)取4个不同的15mL离心管,按照1:1000比例用新鲜的封闭液(现配现用) 稀释抗 TBK1、抗 p-TBK1-Ser172、抗 IRF3 以及抗 p-IRF3 抗体;按同样的操作以 1:2000 的比例稀释抗 Flag、抗 HA、抗 Myc 或抗 GAPDH 的抗体;

(4)把封闭好的 PVDF 膜放入大小合适的孵育盒内,加入适当体积的一抗,以一 抗能够完全覆盖 PVDF 膜为宜; 孵育一抗4℃过夜,回收一抗放入-20℃保存。TBST 洗膜 3 次,每次 8 min;

(5)室温孵育 HRP 标记的抗兔或抗小鼠二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min, 置于 Western blot 成像仪拍照显影,保存图片。

2.2.2.3 WB 检测 I226R 对 cGAS 的表达影响

(1)将 Flag-cGAS(1 μg)、HA-I226R(1.5 μg) 或空载体质粒转染至 HEK293T 细胞 (12 孔板) 24 h 后,按照 1: 1000 加入放线菌酮(CHX),分别处理(0、3、6、9 h), 收集细胞样品,置于4℃垂直混匀仪裂解 30 min 以上,加入 5× Loading buffer; 98 ℃ 金属浴加热样品 15 min,离心 15 min 使细胞沉淀和上清分开。

(2)上样。将处理后的样品轻轻加入 SDS-PAGE 胶的微孔内,进行 SDS-PAGE。 转印至 PVDF 膜后,加入新鲜配制的封闭液置于摇床上室温封闭 60 min 以上;

(3)用新鲜的封闭液以 1:1000 比例稀释抗 Flag、抗 HA 或抗 GAPDH 的一抗, 把封闭好的 PVDF 膜放入孵育盒内,加入适当体积的一抗,以一抗能够完全覆盖 PVDF 膜为准;

(4) 孵育一抗4℃过夜, 回收一抗放入-20℃保存。TBST 洗膜 3次, 每次 8 min;

(5) 室温孵育 HRP 标记的抗兔或抗鼠二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min, 置于 Western blot 成像仪拍照显影,保存图片。

2.2.3 RNA 提取与反转录

RNA 提取步骤如下:

1、取收集好的细胞样品置于涡旋振荡仪上 30s,静置于 EP 管架上 2 min;

2、加入氯仿(Trizol: 氯仿=5:1)后,用移液枪手动混合均匀后静置 2 min;

3、用4℃冷冻离心机 12000 rpm,离心 15 min,等待离心时取等量的 EP 管做好标记,离心过后的样品出现分层,吸取上层水相到新的 EP 管内,注意不要吸到其他层的液体。

4、加入与水相等体积的异丙醇,混合均匀后室温静置 10 min。

5、4 ℃冷冻离心机 12000 rpm, 离心 10 min, 此时 RNA 以白色沉淀的形式出现在 管底,用微量移液器吸弃上清,注意不要吸到底部的 RNA。

6、加入1mL75%乙醇(用 DEPC 水稀释无水乙醇),轻轻洗涤 RNA。4 ℃,8000 rpm 离心 8 min 左右,弃上清,重复洗涤一次。

7、最后一次洗涤结束尽量吸弃上清液体,打开管盖在超净台内晾干 10 min,直到 乙醇挥发。加入 30~50 μL 左右的 DEPC 水溶解 RNA,置于-80 ℃保存或即刻进行反转 录。 反转录步骤:两步反转录法,提前打开 PCR 仪,设置第一步反应程序为:70 ℃ 10 min,4 ℃ 2 min 以上。反应体系(14 µL)如下:

RNA	1 µg	
Oligo(dT)	$2\mu L$	
DEPC 水	补至	14 µL

第二步反应程序为: 30 ℃ 10 min, 42 ℃ 1 h, 70 ℃ 15 min。反应体系(20 µL)如下:

5×M-MLV Buffer	4 µL
dNTPs	1 µL
RNase Inhibitor	0.5 μL
M-MLV	0.5 μL
第一步反应后产物	14 µL

反转录后的 cDNA 可置于-20 ℃保存或进行实时荧光定量 PCR。

2.2.4 实时荧光定量 PCR

将 HA-I226R (3 μg)或空载体转染至 PK-15 细胞中(12 孔板)培养 18 h, 之后转染 Poly(dA:dT) (2 μg)再培养 12 h, 吸弃培养基后, 每孔加入 1 mL 的 Trizol 试剂收集细胞, 按照上述方法提取总 RNA 后反转录, cDNA 稀释 10 倍备用。

将 Flag-cGAS(1 μg)、Myc-STING(1 μg)和 HA-I226R (2 μg)或空载体共转染至 PK-15 细胞(6 孔板)培养 24 h,吸弃培养基后用 Trizol 收集细胞,提取总 RNA 后反转后稀释 10 倍备用。

相对定量 PCR 反应体系(共 20 µL)如下:

cDNA 模板	2 µL
TB Green premix	10 µL
Rox	0.4 µL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
ddH ₂ O	补齐 20 μL

反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 60 °C 34 s, 40 个循环, 其中 60 °C 的反应是 收集荧光。相对定量引物序列如表 2-1 所示,应用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算组间 mRNA 的转录水 平的差异倍数,所有数据均以独立重复 3 次的±s 表示,两组之间的比较采用双尾学生 t-test 检验分析差异显著性,*: P < 0.05,**: P < 0.01,***: P < 0.001。

表 2-1	qPO	R所用引物序列表
Table 2	-1	Primers for qPCR

Gene names	Forward primers $(5' \rightarrow 3')$	Reverse primers (5'→3')
β -actin	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	GGATTCCATGCCCAGGAAGG
IFNA	CTGCTGCCTGGAATGAGAGCC	TGACACAGGCTTCCAGGTCCC
IFNB	TTCGAGGTCCCTGAGGAGAT	ACGGTTTCATTCCAGCCAGT
ISG15	CCCTTGAGGGACTGCATGAT	GACCCTTGTCGTTCCTCACC
ISG54	GCACAGCAATCATGAGTGAGAC	GCTTGCCGTAAGCATTCCAG
ISG56	TCAGAGGTGAGAAGGCTGGT	GCTTCCTGCAAGTGTCCTTC

2.2.5 荧光共聚焦实验

(1) 提前一天将 HEK293T 细胞消化后转移至放好盖玻片的 24 孔板中培养;

(2)待细胞汇合度达 60%~80%时,将 HA-I226R (500 ng)质粒和 Flag-cGAS 质粒(500 ng)共转染至 HEK293T 细胞中,置于 37 ℃细胞培养箱中培养 24 h;

(3)弃去上清培养基,缓慢地加入约 500 μL PBS 清洗细胞,再用微量移液器轻轻吸弃 PBS;

(4)缓慢地加入4%多聚甲醛固定45min;用微量移液器轻轻吸弃4%多聚甲醛,缓慢加入PBS洗一次;

(5)用 0.1%的 Triton X-100(PBS 稀释)透膜 15 min;用 PBS 洗三次后加入用4% BSA(PBS 稀释)室温封闭 1 h;

(6)用 PBS 1: 200 稀释 Anti-Flag 抗体,4 ℃过夜孵育,次日用 TRITC(鼠源) 二抗进行染色,室温作用 1 h 左右,加入 PBS 洗 3 次;

(7)用 PBS 1:200 稀释 Anti-HA 标签抗体 4 ℃过夜孵育,次日用 FITC(兔源)的二抗进行染色,室温作用 1 h 左右,加入 PBS 洗 3 次;

(8) 用 PBS 以 1: 5000 稀释 DAPI, 染色大约 10 min, 随后用 PBS 洗 3 次,

(9)载玻片上滴加 5~7 μL 的封片剂(甘油与 PBS 按 1:1 体积比配制而成),将 盖玻片有细胞的一面对准封片剂放置于载玻片上进行封片后,置于共聚焦显微镜下观 察。

2.2.6 免疫共沉淀试验

(1) 提前将 HEK293T 细胞转移至 10 cm 培养皿中培养;

(2)待细胞汇合度在 80%左右时,将 HA-I226R (4 μg)分别与 Flag-cGAS (3 μg)、
Myc-STING (3 μg)、Myc-TBK1(6 μg)或相应空载体共转染至 HEK293T 细胞中;

(3) 24 h 后弃去培养基,加入 1 mL 细胞裂解液收集细胞。固定于 4 ℃垂直混匀 仪裂解 30 min 以上,转速约为 50 转/min;离心至细胞沉淀与上清分离。吸取 80 μL 上清细胞裂解液,加 20 μL 5×Loading buffer,置于 100 ℃金属浴中加热样品 10 min, 置于-20 ℃作为 input (WCL) 组备用;

(4)剩余上清转移至新的 EP 管中用作 IP 检测 。将 Beads 混匀后,使用平口枪
头轻轻吸取,用 Lysis buffer (150 mM NaCl)清洗磁珠 2 次;剩余上清样品中加入 20 μL
Anti-Flag-Beads 或 Anti-Myc-Beads, 4 ℃混匀旋转仪混合过夜,转速约 10 转/min;

(5)从混匀旋转仪取出,用 Lysis buffer (300 mM NaCl)和 Lysis buffer (150 mM NaCl)洗涤 5~7次,每次固定于混匀旋转仪上洗涤 7 min 左右,转速约 55 转/min;4℃, 3500 rpm 离心 2 min,吸弃上清,注意不要吸到 beads;

(6)最后一次离心,将残留的液体尽量吸干净,加入 20~40 μL 的 150 mM Lysis buffer 混匀后,加入相应比例的 5×Loading Buffer,金属浴 100°C 煮样 15 min,离心后 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

2.3 结果

2.3.1 pI226R 抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素的激活

为探究 ASFV 非结构蛋白 I226R 调节 cGAS-STING 信号通路的机制,在 PK-15 细胞中转染 pIFN-β-Luc、pRL-TK-luc、Flag-cGAS、Myc-STING 质粒或是 poly(dA:dT) 以及不同剂量的 HA-I226R 质粒,检测其荧光素酶活性,发现 pI226R 能显著抑制 cGAS-STING 和 poly(dA:dT)诱导的 IFN-β 的激活,并呈现剂量依赖的作用(图 2-1A、B)。

在 PK-15 细胞中转染 cGAS、STING 以及 HA-I226R 或空载体, 24 h 后, 提取细胞 RNA, 通过荧光定量 PCR 检测 IFNα、IFNβ、ISG15、ISG54 和 ISG56 的 mRNA 水平, 在 PK-15 细胞中转染 HA-I226R 或空载体, 18 h 后转染 poly(dA:dT)刺激 12 h, 用 Trizol 提取细胞, 通过荧光定量 PCR 检测上述抗病毒基因的 mRNA 水平。

结果表明, pI226R 能显著抑制 cGAS-STING (图 2-1 C-G) 和 poly (dA:dT) (图 2-1 H-L) 诱导的 I 型干扰素的激活。以上结果表明, pI226R 能够显著抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素信号通路。



图 2-1 pI226R 蛋白抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素。

(A): pI226R 以剂量依赖性方式抑制 cGAS-STING 介导的 IFN-β。(B): pI226R 以剂量依赖性方 式抑制 Poly(dA:dT)介导的 IFN-β。(C-G): 在 PK-15 细胞中, pI226R 抑制 cGAS-STING 诱导的 抗病毒基因的转录。(H-L): 在 PK-15 细胞中, pI226R 抑制 Poly(dA:dT)诱导的抗病毒基因转录。 EV: 空载体;所有实验重复三次,结果相似; ns: 没有意义;*: P < 0.05;**: P < 0.01; ***: P < 0.001。 **Figure 2-1 pI226R protein inhibits cGAS-STING mediated type I interferon.** (A): pI226R inhibits cGAS-STING mediated IFN-β in a dose-dependent manner. (B): pI226R inhibits Poly(dA:dT) mediated IFN-β in a dose-dependent manner. (C-G): pI226R inhibits cGAS-STING-induced transcription of antiviral genes in PK-15 cells.(H-L): pI226R inhibits Poly(dA:dT)-induced transcription of antiviral genes in PK-15 cells. EV: empty vector; all experiments were repeated three times with similar results; ns:no significance; *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

2.3.2 pI226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化

我们检测了 cGAS-STING 通路下游内源蛋白 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平。在

HEK293T 细胞中共转染 Flag-cGAS、Myc-STING 和 HA-I226R 或相应空载体的表达质 粒,分别在转染后 12、24、36、48 h 收集细胞样品,用免疫印迹分析的方法检测了 TBK1 和 IRF3 蛋白的磷酸化水平。过表达 cGAS 和 STING 可以增加 TBK1 和 IRF3 的 磷酸化水平(图 2-2A),而 pI226R 对这种磷酸化水平显示出明显的抑制作用(图 2-2 B-C)。因此,pI226R 可以抑制 cGAS-STING 激活的 TBK1 和 IRF3 磷酸化。



图 2-2 pI226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平。(A): pI226R 抑制 TBK1 和 IRF3 磷酸化。(B-C): HEK293 细胞中 p-TBK1 / TBK1 和 p-IRF3 /IRF3 的比例,来自独立重复三次的实验。ns: 没有意义; *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01; ***: *P* < 0.001。

Figure 2-2 pI226R inhibits TBK1 and IRF3 phosphorylation levels. (A): pI226R inhibits TBK1 and IRF3 phosphorylation. (B-C): The ratio of p-TBK1/TBK1 and p-IRF3/IRF3 in HEK293 cells from three independent experiments. ns: no significance; *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

2.3.3 cGAS 是 pI226R 抑制 cGAS-STING 通路激活的靶蛋白

为了深入探究 pI226R 调控 cGAS-STING 信号通路的潜在靶点。利用双荧光素酶 报告基因系统实验检测 pI226R 对 cGAS-STING 信号通路上关键蛋白的影响作用:将 Flag-cGAS、Myc-STIING、Myc-TBK1 以及 Flag-IRF3 分别与 pIFN-β-Luc、 pRL-TK-luc 以及 HA-I226R 三者共转染。结果表明,pI226R 的过表达显著抑制了 cGAS 激活的 IFN-β 启动子的活化(图 2-3A),而对 STING、TBK1 和 IRF3 诱导的 IFN-β 报告基因启动子的 活化并没有抑制作用(图 2-3B-D),这表示 pI226R 的靶点并不是 STING、TBK1 和 IRF3。 为了进一步探索其潜在靶点,我们将 HA-I226R 分别与 Flag-cGAS、Myc-STING、 Myc-TBK1 以及 Flag-IRF3 共转染至 HEK293 细胞,24 h 后收取细胞样品,免疫共沉 淀试验显示 pI226R 与 cGAS 存在相互作用(图 2-3 E-H)。此外,我们将 HA-I226R 和 Flag-cGAS 共转染至 293T 细胞,利用荧光共聚焦观察二者的共定位情况,结果显 示 pI226R 与 cGAS 存在共定位现象(图 2-3 I)。进一步在 PK-15 细胞内进行免疫共 沉淀实验,结果表明,pI226R 与内源性 cGAS 能够发生相互作用(图 2-3 J)。由此得 到: pI226R 靶向 cGAS 并与之相互作用,从而抑制 cGAS-STING 通路的激活。



图 2-3 cGAS 可能是 pI226R 抑制 cGAS-STING 通路的潜在靶点。

(A-D):用 pIFN-β-Luc(100 ng/孔)、pRL-TK-luc(20 ng/孔)、HA-I226R(200 ng/孔)表达质粒或空载体和 Flag-cGAS(200 ng/孔)、Myc-STING(200 ng/孔)、Myc-TBK1(200 ng/孔)或 Flag-IRF3(200 ng/孔) 表达质粒转染 HEK-293T 细胞 24 h,然后进行荧光素酶活性测定。进行了三个独立的实验,结果 相似。ns:没有意义;*,*P*<0.05;**,*P*<0.01;***,*P*<0.001。(E-H): pI226R 与 cGAS 相互作用。 HEK293T 细胞转染 HA-I226R(3 μg)和 Flag-cGAS(4 μg)、Myc STING(4 μg)、Myc-TBK1(6 μg)以及 Flag-IRF3(4 μg)表达质粒,24 h 后裂解细胞,裂解物用抗 Flag 抗体或抗 Myc 抗体免疫沉淀,并进 行蛋白质印迹。(I): pI226R 与 cGAS 共定位。(J): pI226R 与内源性的 cGAS 相互作用。

Figure 2-3 cGAS might be the potential target for pI226R to suppress cGAS-STING pathway. (A-D): HEK-293T cells were transfected with with pIFN-β-Luc (100 ng/well) expression plasmid, pRL-TK-luc (20 ng/well) plasmid, HA-I226R (200 ng/well) expression plasmid or empty vector and Flag-cGAS (200 ng/well), Myc-STING (200 ng/well), Myc-TBK1 (200 ng/well), or Flag-IRF3 (200 ng/well) expression plasmids for 24 hours followed by luciferase assays. Three independent experimentation were conducted with similar results. ns: no significance; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***: *P* < 0.001. (E-H): pI226R interacts with cGAS. HEK293T cells were transfected with HA-I226R (4 μg) and Flag-cGAS (3 μg), Myc STING (3 μg), Myc-TBK1 (6 μg) and Flag-IRF3(4 μg) for 24 hours, Cells were lysed, and the lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody or anti-Myc antibody and subjected to Western blotting. (I): Colocalization pI226R with cGAS. (J): pI226R interacts with endogenous cGAS.

2.3.4 pI226R 通过自噬途径降解 cGAS

进一步探究 ASFV I226R 蛋白靶向 cGAS 产生的具体机制,我们首先想到蛋白之间的相互作用有可能影响其中某个蛋白的稳定性。因此,在共转染实验中,加入放线菌酮(CHX)分别对细胞进行处理0、3、6、9h后,免疫印迹检测分析了 Flag-cGAS的表达,结果显示 pI226R 影响了 cGAS 蛋白稳定性,并对其具有降解作用(图 2-4A)。细胞内蛋白的降解主要依赖于泛素-蛋白酶体途径和自噬体-溶酶体途径,我们进一步探究了 pI226R 对 cGAS 的降解途径,HEK293T 细胞中共转染 HA-I226R 和 Flag-cGAS,转染 24 h 分别用 DMSO、蛋白酶体抑制剂(MG132)、自噬途径抑制剂氯化铵(NH4CL)处理细胞 8 h,结果表明了氯化铵(NH4CL)处理组抑制了 pI226R 对 cGAS 的降解, cGAS 的蛋白水平有所回升,因此,pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS(图 2-4B)。 2.3.5 pI226R 影响 cGAS 活化

从 cGAS-STING 通路的活化角度看, TRIM56 作为 cGAS 的 E3 连接酶, 能够诱导 其发生单泛素化, 增强 cGAS 与 DNA 的结合活性, 对 cGAS 的激活具有重要意义^[164]。 为了探究 pI226R 与 cGAS 相互作用是否影响 cGAS 的生物学功能,我们猜想是: pI226R 可能干扰了 cGAS 与 TRIM56 的相互作用这个关键步骤。在 HEK293T 细胞中 共转染 His-TRIM56、Flag-cGAS 和 HA-I226R, 24 h 后用细胞裂解液收集样品并进行 免疫共沉淀实验,结果显示 pI226R 的过表达抑制了 TRIM56 与 cGAS 的相互作用(图 2-4C)。我们进一步发现了在 pI226R 过表达情况下,由 TRIM56 介导的 cGAS 单泛素 化明显减弱(图 2-4D)。以上结果均表明, pI226R 减弱 cGAS 与 TRIM56 相互作用, 抑制了 cGAS 的单泛素化,从而阻断 cGAS-STING 通路的信号传导。



图 2-4 pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS。(A): I226R 可降解 cGAS。cGAS 丰度的变化使用 GAPDH 均一化。(B): pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS。cGAS 丰度的变化使用 GAPDH 均一化。ns: 无意义, *, *P* < 0.05;**, *P* < 0.01。(C): pI226R 阻断了 TRIM56 和 cGAS 之间的 相互作用。(D): pI226R 减弱了 TRIM56 介导的 cGAS 单泛素化。

Figure 2-4 pI226R degrades cGAS via the autophagy-lysosomal pathway. (A): pI226R degrades cGAS. The changes in the abundance of cGAS were normalized to GAPDH. (B): pI226R degrades cGAS via the autophagy-lysosomal pathway. The changes in the abundance of cGAS were normalized to GAPDH. ns: no significance, *, P < 0.05; **, P < 0.01. (C): pI226R blocks the interaction between TRIM56 and cGAS. (D): pI226R inhibits TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS.


图 2-5 pI226R 抑制 cGAS-STING 信号通路的模型示意图。巨噬细胞被 ASFV 感染后, pI226R 在 细胞质被翻译, 然后与 cGAS 相互作用, 通过自噬-溶酶体途径触发 cGAS 降解, 并通过减少 cGAS 与 TRIM56 的结合来削弱 cGAS 的活化。因此 pI226R 抑制 I 型干扰素的活化以逃避抗病毒先天免 疫。

Figure 2-5 Schematic model of pI226R suppresses the cGAS-STING signaling pathway. After macrophages are infected by ASFV, the pI226R is translated in the cytoplasm, then interacts with cGAS, triggers cGAS degradation via the autophagy-lysosomal pathway, and weaken activation of cGAS by reducing the binding of cGAS to TRIM56. Therefore pI226R inhibits the activation of type I interferon to evade the antiviral innate immunity.

2.4 讨论

非洲猪瘟病毒编码众多免疫逃逸蛋白,不同的免疫逃逸蛋白有不同的免疫逃逸机制,有的蛋白具有多种不同的功能,靶向宿主体内不同的免疫过程达到促进复制的效果。例如: pMGF505-7R 蛋白不仅靶向并降解 STING 而负向调节 cGAS-STING 信号 通路,还能够上调 RNF125 的表达,促进 JAK1 和 JAK2 的降解^[52, 53]。pI215L 蛋白作

为一种泛素偶联的 E2 酶,通过募集抑制 IFN-β 产生的泛素 E3 连接酶 RNF138,降解 RNF128 并减少 TBK1 的 K63 连接的泛素化从而抑制 cGAS-STING 介导的 I 型 IFN 产 生^[66];在另一项研究中 pI215L 蛋白与 IRF9 相互作用并促进其降解从而抑制干扰素刺激的反应元件(ISRE)的活性和干扰素刺激基因(ISGs)的转录^[67]。这些研究结果说 明,ASFV 编码的蛋白质有可能通过多种机制和途径拮抗宿主的抗病毒天然免疫反应。 弄清这类机制为研发抗非洲猪瘟精准靶向药物和安全有效的疫苗奠定理论基础,以及 为研究其他病毒的免疫逃逸机制提供思考方向。

2013年首次发现的一种新的胞内 DNA 感受器 cGAS 不仅能识别外源致病性 DNA, 还能识别机体自身的异常的 DNA^[162]。正常的真核细胞内只有细胞核与线粒体内含有 DNA,当 DNA 病毒等病原体入侵细胞后,细胞质中就会出现异常定位的 DNA^[165]。 cGAS 的 N 末端和 C 末端结构域均参与 DNA 的结合过程,cGAS 与 dsDNA 以 1:1 的配比,组合成一个 cGAS-dsDNA 寡聚复合物,从而导致 cGAS 的结构发生重构,之 后由 ATP 和 GTP 合成 2,3-cGAMP。其中,已经证明 TRIM 家族成员 TRIM56 的 NHL 同源区域(aa 307~755)与 cGAS 的 N 末端调控结构域 RD (aa 1~160)相互作用,诱 导 cGAS 的发生 Lys335 单泛素化,导致 DNA 结合活性和 cGAMP 的产生均显著增加 ^[164]。cGAMP 结合位于内质网的干扰素刺激蛋白 STING,并导致 STING 构象发生变 化,进而发生了转位,转移至高尔基体,最终转位至细胞核周围^[166]。活化的 STING 招募 TBK1 和 IRF3 并促进其二者磷酸化进而触发 I 型干扰素的产生^[167]。

I226R 基因位于 ASFV 基因组的 3'末端,且在不同的毒株中高度保守,已有研究 表明 I226R 是 ASFV 的一个重要毒力基因,删除 I226R 基因后的毒株与亲本相比毒力 明显减弱^[137]。pI226R 蛋白定位于细胞质的病毒工厂内,在感染 ASFV 后 2 h 时能够检 测到 pI226R 的表达,在感染 8 h 时达到表达峰值,并在整个的感染周期中都能检测到, 这些数据意味着,pI226R 可以在病毒感染的早期和晚期表达^[137]。转录曲线类似于 ASFV 的 B646L 蛋白,删除 I226R 基因之后 SY18 完全失去毒力,被感染的猪能够抵 御 SY18 亲本的攻击^[137]。pI226R 的过表达抑制 NF-κB 和干扰素调节因子 3(IRF3)的 激活,导致了 NF-κB 必需调节物 (NEMO)蛋白的泛素化降解^[168]。这表明 ASFV I226R 蛋白可能通过多种机制拮抗宿主的抗病毒反应。

为研究 ASFV I226R 蛋白调控 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素分泌的分子机制, 深入探究病毒和宿主之间的相互作用机理。在前人研究的基础上,本章首先通过双荧 光素酶报告基因系统实验以及荧光定量 PCR 实验,探究 pI226R 对 cGAS-STING 的信 号通路的影响,随后对具体机制展开进一步探索。本章研究发现 ASFV I226R 蛋白能 显著抑制 cGAS-STING 和 poly(dA:dT)介导的抗病毒相关基因的转录,同时靶向 cGAS 并通过自噬-溶酶体途径对其进行降解,此外 pI226R 显著减弱 cGAS 与其 E3 连接酶 TRIM56 的结合作用,并抑制了由 TRIM56 介导的 cGAS 的单泛素化,从而发挥抗病 毒效应。

2.5 小结

1、通过双荧光素酶报告基因系统和荧光定量 PCR 实验,得到 pI226R 蛋白抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素的激活; Western blotting 进一步证明 pI226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化;

2、发现 pI226R 靶向 cGAS 相互作用并对其降解,这种降解作用是通过自噬-溶酶 体途径;

3、pI226R 减弱了 cGAS 与其 E3 连接酶 TRIM56 的结合,抑制了由 TRIM56 介导的 cGAS 单泛素化。

第三章 重组蛋白 I226R 表达与纯化

ASF 是一种以高热、出血为特征的高接触性传染性疾病。20 世纪初,首次在非洲爆发的 ASF 疫情,致死率达 100%^[11]。1957 年,ASFV 的基因 I 型首次跨大洲传播,从非洲传入欧洲的葡萄牙,于是欧洲多国相继采取猎杀野猪和扑杀感染猪的综合疫情防控措施,1971 年后病毒又入侵到了南美洲和加勒比等地区,此后非洲猪瘟疫情在全球流行,在多方共同严格管控和共同努力下,一段时间内疫情的扩散得到控制,直至2007 年,东欧的格鲁吉亚地区报道了首例 ASF,紧接着传入俄罗斯和亚洲地区,包括中国在内的亚洲多个国家也先后向 OIE 上报了疫情情况^[15]。2018 年 8 月,中国沈阳市发现首个非洲猪瘟病例,随后迅速蔓延至全国多个省份,猪群数量减少导致猪肉和生猪价格上升,给我国的生猪肉市场造成严重的冲击,一时之间高价猪肉靡然成风,致使人民生活水平急剧下降。

ASFV 是多层的正六面体结构,双链的 DNA 基因组长度约在 170 kb~190 kb 之间,基因组中间是保守区,约 125 kb,两端是可变区^[25,31]。I226R 基因位于 ASFV 基因组的 3'末端,且在不同的毒株中同源性达 90%以上,同时是一个高度保守的基因^[137]。

大肠杆菌表达系统具有成本低、生长周期短、遗传代谢背景清晰、不易污染和操作简便等优势,能够快速实现蛋白的高效和大量表达,是实验室常用的原核表达系统。 其中 pET 系列表达载体是应用最为广泛的高效表达载体,具有表达产量高、成功率 高和适用范围广等优点。因此本章研究利用 pET-30a 表达载体构建了原核表达质粒, 通过表达纯化 ASFV I226R,为建立一种检测 ASF 血清抗体的间接 ELISA 方法以及 深入研究 I226R 蛋白的生物学功能打下基础,可通过酵母双杂交实验、免疫共沉淀 (Co-IP)实验筛选相应的互作蛋白,进一步探究 ASFV 复杂的致病机制。

3.1 材料

3.1.1 细胞与菌株

人胚胎肾上皮细胞 (HEK293T)为本实验室冻存,TOP10 感受态细胞 和 BL21 (DE3) 感受态细胞购于北京擎科生物科技有限公司(Tsingke Biotechnology)。

3.1.2 主要载体、试剂

pET-30a(+)载体、pEGFP-N1载体为本实验室保存;

T4 DNA 连接酶购自于 NEB 公司; rTaq、dNTPs、限制性内切酶和高保真酶 Prime STAR 均购自宝生物工程(大连)有限公司(TakaRa Bio); DNA Marker 均购自诺唯赞 生物科技有限公司;

IPTG、弗氏完全佐剂以及弗氏不完全佐剂均购买自 Sigma 公司; Ni 层析介质 (NTA)重力预装柱套装购自博奥龙公司; PVDF 膜购自宝生物工程有限公司 (TakaRa

Bio); Western blotting 发光液购自大连美伦生物技术有限公司;彩色预染蛋白标准 Marker(10 kDa~180 kDa)购自 GenStar 公司;超滤管购买于 Millipore; TMB 显色液、 考马斯亮蓝染液均购买于碧云天生物技术(Beyotime)有限公司;

抗体: HRP 标记的 IgG 及 HRP 标记羊抗猪 IgG、IgG H&L (Alexa Fluor® 488)、IgG H&L (Alexa Fluor® 647)以购自艾博抗(上海贸易有限公司); His-Tag 鼠源单克隆抗体购自博奥瑞京(北京)公司; DAPI购买自生工生物工程(上海)股份有限公司;

试剂盒: 无内毒素质粒小提试剂盒、通用型 DNA 纯化试剂盒均购买于天根生化 (北京) 生物科技有限公司; BCA 试剂盒购买于碧云天 (Beyotime) 生物技术有限公司;

所用主要试剂配方如下:

(1) PBS	1 L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.63 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

(2)10×TBST 洗涤液	1 L
Tris	24.2 g
NaCl	87.6 g
KCI	3.73 g
Tween-20	20 mL

用浓盐酸将 PH 调到 7.4,用 ddH20 将体积补足到 1000 mL

(3) 复性缓冲液(Refolding buffer)	pH=8.0
100 mM	Tris-HCl
400 mM	L-精氨酸(L-arginine)
2 mM	EDTA-Na
5 mM	谷胱甘肽 (glutathione) [GSH]
0.5 mM	L-氧化型谷胱甘肽
(4) 裂解 buffer: 50 mM Tris; 5 mM	4 EDTA; 0.8% NaCl; 调节 pH 至 8.5
(5) Buffer B: 8 M 尿素, 0.1 M Nal	H ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, 调节 pH 至 8.0
(6) Buffer C: 8 M 尿素, 0.1 M Nal	H ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, 调节 pH 至 6.3
(7) Buffer D: 8 M 尿素, 0.1 M Nat	H ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, 调节 pH 至 5.9
(8) Buffer E: 8 M 尿素, 0.1 M Nal	H ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, 调节 pH 至 4.5

3.1.3 所使用的主要仪器

_ 仪器	公司
超声破碎仪	Thermo Fisher Scientific, 美国
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific, 美国
NanoDrop 分光光度计	Thermo Fisher Scientific, 美国
PH 调节仪器	Sartorius 公司
垂直混匀仪	宁波新芝生物科技股份有限公司
冰箱	中科美菱
超纯水仪	Millipore 公司
制冰机	DEMASHI
恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司
核酸电泳仪	杭州厚泽生物科技有限公司
可调节温度的冷冻离心机	Eppendorf,德国
微量移液器	Eppendorf,德国
PCR 仪	Eppendorf,德国
核酸凝胶成像仪	上海金鹏分析仪器有限公司
Western blot 成像仪	LI-COR Biosciences 公司,美国

3.1.4 实验动物

6~8 周龄的 BALB/C 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

3.2 方法

3.2.1 I226R 基因的引物设计

编码 ASFV-SY18 毒株 (GenBank No. MH766894)的 I226R 全长序列通过密码子 优化后基因合成 (北京擎科生物科技有限公司) pCAGGS-HA-I226R。同时设计上、下 游引物并插入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点.以合成是质粒为模板,进行 PCR 扩增得到目 的片段产物,构建到两个不同的表达载体上。

原核表达质粒引物序列:上游引物 I226R-F:5'gaattcAAATACGATAGAATCGCGGGG;下游引物 I226R-R: 5'-ccctcgagTGTATATGTCCGCTACTTCG。

真核表达质粒引物序列:上游引物 I226R-F: 5'ctcgagAAATACGATAGAATCGCGGG;下游引物 I226R-R: 5'-aagaattcTGTATATGTCCGCTACTTCG。

3.2.2 I226R 基因扩增克隆及质粒构建

(1) 以合成的 PCAGGS-HA-I226R 质粒为模板,用上述引物进行目的基因片段的 扩增,反应体系(50 µL)如下:

5* PrimeSTAR Buffer	10 µL
dNTPs	4 µL
I226R-F	1 µL
I226R-R	1 µL
质粒模板(100 ng/µL)	1 µL
PrimeSTAR 高保真酶	0.5 µL
ddH ₂ O	32.5 µL

将上述各组分依次加入 PCR 管中,离心混匀,置于 PCR 仪中进行扩增反应。PCR 扩增反应条件: Step 1: 98 ℃预变性 2 min; Step 2: 98 ℃变性 10 s; Step 3: 58 ℃退 火 10 s; Step 4: 72 ℃延伸 10 s, Step 2 至 Step 4 共 35 个循环; 72 ℃延伸 5 min; 得 到 PCR 扩增产物。

(2)用 EcoR I 和 Xho I 对 pET-30a、pEGFP-N1 空载体在 37 ℃水浴锅过夜双酶 切,产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定后,切下胶块,称量重量,用天根 DNA 胶回收试 剂盒纯化回收,利用 NanoDrop 分光光度计对回收到的载体片段进行浓度测量;

(3)使用限制性核酸内切酶对 PCR 扩增到的目的片段进行双酶切,按照天根 DNA 胶回收试剂盒说明书进行胶回收操作,利用 NanoDrop 分光光度计对回收到的目的片 段进行浓度测量,酶切体系(50 μL)如下:

目的片段或载体	2 µg
EcoR1	2.0 µL
Xhol	2.0 µL
ddH2O	补齐至 50 μL

(4)用 NEB 公司生产的 T4 连接酶在 16 ℃下,将回收产物与原核表达载 pET-30a 和真核表达载体 pEGFP-N1 进行连接过夜,载体与目的基因的摩尔比例为 1:10,连接体系如下:

目的片段	0.3 pmol
载体	0.03 pmol
10×T4 Buffer	2 µL
T4 DNA ligase	1 μL
ddH ₂ O	补齐至 20 μL

(5)连接产物转化:从-80 ℃冰箱取出 TOP10 感受态细胞,置于冰上融化,在超 净台内打开转化后的产物,取出全部产物与感受态细胞混匀;静置冰上 30 min,此时 打开水浴锅设置到 42 ℃;固定于漂浮板后置于 42 ℃水浴锅热激 1 min 30 s 后,重新 放入冰上静置 5 min,用微量移液器加入 1 mL 的无抗性的 LB 液体培养基,在 37 ℃摇 床中培养 1 h;取出后,常温条件下 4000 rpm 离心 5 min,吸出上层液体直到管中剩余 100 μL 左右,吹打混匀后涂布于卡钠抗性的 LB 平板,37 ℃倒置过夜培养 12 h。

(6) 菌液 PCR 鉴定阳性样品,目的基因条带正确的样品,取 100 µL 送至公司测序。测序正确的菌液样品加 100 µL 左右至 15 mL 的液体培养基中培养 12 h 左右,使用无内毒素小提质粒试剂盒提取质粒,测定浓度后进行双酶切鉴定。取 500 µL 鉴定正确的样品至新的 1.5 mL 的 EP 管中,加入 500 µL 灭菌的 80%的甘油,保存与-80 ℃冰箱。命名为 pET-30a-I226R 和 pEGFP-I226R,置于-20 ℃冰箱保存。

3.2.3 重组质粒的原核表达以及纯化

预处理: 取适量体积的 Ni 柱到带有滤纸的注射管中,首先以无菌水冲洗柱子,体积比为(无菌水:柱子=8:1)遍; 挂 Ni,按照 NiSO4 溶液:柱子的体积比为 8:1 加入 0.1 M 的 NiSO4,让液体自然流出;再次用无菌水冲洗柱子,大约用柱体积 6 倍的无菌水,除去多余的 Ni;用酸性 Buffer 冲洗柱子;最后加入 Buffer B 平衡 Ni 柱,与柱子的体积比为 6:1,若是新柱子则无需做挂 Ni 步骤。

(1)打开水浴锅设置为 42 ℃。取 2 µL 重组质粒 pET-30a-I226R 加入 BL21(DE3) 感受态细胞中混匀,静置冰上 30 min。置于 42 ℃水浴锅 1 min 30 s 热激。取出再次静置冰上 5 min。用微量移液器吸取全部液体于 LB 平板(Kana+)上,涂布均匀后 37 ℃ 细菌培养箱培养 10 min 后过夜培养。

(2)在超净台操作:酒精灯烧镊子,冷却后夹取高压灭菌的 10 μL 小枪头,轻轻蘸取单菌落,将小枪头放入 10 mL 的 LB 液体培养基(Kana+)中,培养至 OD₆₀₀为 0.6~0.8 时,分别在 37 ℃和 16 ℃条件下加入 IPTG(1: 1000)诱导表达 2、4、6、8、10、12 h 后收集菌体,通过 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达情况。

(3) 收集超声裂解后的上清及沉淀 SDS-PAGE 对表达产物进行可溶性分析。

(4)将重组蛋白的质粒 pET-30a-I226R 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 挑取单菌落接种于 10 mL 的 LB 液体培养基(Kana+)中,活化后接种于 1L 的 LB 液 体培养基(Kana+),比例为菌液:LB 液体培养基 1:100。在(1)中摸索出来的条 件下,置于细菌摇床 220 rpm/min 培养至 OD₆₀₀为 0.6~0.8 时,按照 1:1000 加入 IPTG 诱导表达,用 Thermo 落地式冷冻离心机 8000 rpm 离心 10 min 培养的 LB 液体,弃掉 上清,收集菌体沉淀。

(4)用 PBS 重悬、洗涤菌体沉淀后再次利用 Thermo 落地式冷冻离心机 4 ℃、8000 rpm 离心菌体,收集沉淀,弃去上清。

(5) 用裂解 buffer 重悬菌体, 8000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体;

(6) 在4 ℃条件下,将菌体用裂解 buffer 重悬,进行超声破碎直到溶液眼观呈 现澄清,参数设为:开 3s;关 3s,总时长为 40 min。4 ℃、8000 rpm 离心 10 min,收 集沉淀弃掉上清;

(7) 将沉淀用 PBST 洗涤, 4C, 8000 rpm 离心 15 min, 重复 3 次;

(8) 将沉淀用 2 M 尿素洗涤, 4C, 8000 rpm 离心 15 min, 重复 1 次;

(9) 将沉淀用1MNaCI洗涤, 4C, 8000 rpm 离心 15 min, 重复1次.

(10)将沉淀用 6 M 盐酸胍变性剂重悬,4 ℃混匀至沉淀逐渐溶解,8000 rpm 离 心 25 min,分离出上清;

(11) 将上清以 1:50 的比例用 Bufer B 稀释,用 0.22 μm 滤器过滤后加入到平衡 好的 His 标签蛋白纯化柱中,让蛋白和柱子充分结合后,流出穿透液;

(12) 用 10 倍柱体积 Buffer C 洗涤杂蛋白, 流出穿透液;

(13) 3 倍柱体积 Buffer D 洗脱目的蛋白, 流出穿透液;

(14) 3 倍柱体积 Buffer E 洗脱目的蛋白,得到纯化好的蛋白;

(15) 进行 SDS-PAGE 检测纯化效果。

3.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶:取两块玻璃板洗净、晾干,将其固定在制胶架上,制胶架子置 于平整的桌面,检查是否漏水,晾干。将按照说明书配好的分离胶轻轻加到两块玻璃 板之间,至合适的位置。缓慢注入异丙醇,防止分离胶挥发。室温静置1h直到凝固, 等待凝固之时取出完好的梳子洗净擦干备用,将上层异丙醇倒掉,注入备好的分离胶 后立刻插入梳子,动作轻盈避免产生气泡,在室温放置30min直到凝固。向电泳槽内 加入 1×Running Buffer。将凝胶放于电泳槽中,将梳子轻轻拔出,按顺序往孔内加入 蛋白质 Marker 以及样品,记录加样顺序。打开电泳仪开关,设置电压为80V并启动, 约20min 后将电压调至120V。也可全程设置为80V,结束后关闭电源。

3.2.5 考马斯亮蓝染色

考马斯亮蓝染色:按照上述电泳步骤进行电泳后,拆掉玻璃板,弃掉上层浓缩胶后将凝胶置于孵育盒内,倒入考马斯亮蓝染液,室温下染色 3~4 h,回收染色液放入 4 ℃ 保存。随后用脱色液脱色,直到条带清晰、背景干净为止。最后进行拍照保存。

3.2.6 免疫印迹分析

转膜:取出电泳胶,切下浓缩胶弃掉,把分离胶置于转膜 buffer 中;剪裁两张稍 大于分离胶的滤纸、一张略大于滤纸的 PVDF 膜;将滤纸放入转膜 buffer 中完全浸湿; PVDF 膜在甲醇中激活 15 s 左右;从上到下的顺序依次往转膜仪中放置:滤纸、分离 胶、PVDF 膜和滤纸,用干净的玻璃试管赶出气泡;设置转膜电压为 15 V,按照蛋白 大小设定转膜时间。

封闭: 取 15 mL 离心管, 按照 1%的 BSA+5%的脱脂奶配制封闭液, 然后用移液 枪取适量的 TBST (0.05% Tween-20)溶解,将离心管放置于 4 ℃垂直旋转仪上使之完 全溶解。将转膜完成的 PVDF 膜放置于封闭液中,室温封闭至少 1 h,或 4 ℃封闭过夜。

抗体孵育:按稀释比例加入一抗 4 ℃孵育过夜:用 TBST 稀释的 ASFV 阳性血清(1:400);用 TBST 稀释的鼠多克隆抗体(1:1000)。洗膜:用 TBST 洗膜 3 遍,每次 10 min。将 HPR 标记的二抗用封闭液稀释(抗鼠/兔 IgG-HRP 稀释比为 1:5000,抗羊抗猪的 IgG-HRP 稀释比为 1:8000),室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10

min∘

显影:将 HRP 化学发光试剂中的 A、B 液等体积比混合,覆盖整个 PVDF 膜, 置于 Western blot 成像仪拍照显影,保存图片。

3.2.7 多克隆抗体的制备

3.2.7.1 蛋白的浓缩

使用超滤离心管对纯化后的蛋白进行浓缩。(1)将纯化后的蛋白用 0.22 µm 滤器 进行过滤处理;(2)将过滤后的蛋白装入截留分子量为 10 K 的 15 mL 超滤管中,4 ℃、 3000 g 离心,倒去滤液再次离心,多次重复离心,得到想要的浓缩倍数即可停止。例 如:纯化后的蛋白溶液体积为 20 mL,离心至超滤管内上层液体刚好剩余 2 mL 时,即 蛋白被浓缩 10 倍。

3.2.7.2 蛋白的透析

(1)将上述浓缩蛋白,取1.5 mL加入13.5 mL经0.22 μm滤器过滤后的PBS溶 液中,混匀;

(2)继续装进截留分子量为10K的15mL超滤管中,4℃、3000g离心;

(3)离心至超滤管内上层液体刚好剩余 1.5 mL 为止,即浓缩蛋白被进行了 10 倍体积换液。如需进行 20 倍换液则重复操作此步骤,一般进行 10~20 倍换液视为蛋白存 在介质已经被替换掉,以此代替透析袋透析换液。

3.2.7.3 多克隆抗体的制备

(1)取 50 µg 浓缩、透析后的蛋白与弗式完全佐剂等体积 1:1 混合、乳化。

(2)用一次性注射器后腿肌肉多点注射的方式免疫 6~8 周龄 BALB/C 雌性小鼠, 对照组小鼠注射等体积的 PBS 溶液。

(3)将蛋白与弗式完全佐剂等量混匀、乳化后再次采取初次免疫,初免后1周, 再次采取相同的免疫进行二次免疫,第三次免疫在二次免疫后两周进行。

(4) 三兔后一周进行小鼠眼眶静脉窦采血。用镊子夹住老鼠尾巴转移到呼吸麻醉 盒内,检查麻醉剂的量是否在标准线以上,打开气体麻醉机器开关,关紧盖子,直到 小鼠躺下且呼吸均匀。左手抓住小鼠两耳及尾巴固定,使静脉窦充血,同时眼球向外 鼓出;右手用毛细管插入小鼠内眼角与眼球之间的位置,朝着喉头方向轻轻试探刺入, 大约插入 2-3 mm 感到阻力时,轻轻旋转毛细管直至静脉血顺毛细管流出,用 EP 管接 住,每只眼球六滴血左右。

(5)拔出毛细管用干净的棉花按压止血。

(6)将小鼠血液置于 37 ℃静置 1 h, 再 4 ℃静置过夜, 次日 8 000 rpm 离心 10 min 分离血清, 保存于-80 ℃。

3.2.8 BCA 法测定蛋白浓度

制备稀释的标准品:取10μL蛋白标准品用 PBS 稀释稀释终浓度为 0.5 mg/mL。

配制 BCA 工作液: 按照体积比为 BCA 试剂 A: BCA 试剂 B=50:1, 配制适量 BCA 工作液, 具体体积根据样品量确定。充分混合均匀配制成 BCA 工作液。

标准品吸光度测定: (1)将稀释后的浓度为 0.5 mg/mL 标准品再次稀释成浓度分 别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL。每孔加 20 μL 标准样品测量吸 光度。

(2)加20μL 待测样品到96 孔板的样品孔中。如果样品不足20μL,加PBS 补 足到20μL,并记录样品体积,方便后续计算。

(3) 各孔加入 200 µL 上一步配制好的 BCA 工作液, 37 ℃放置 20~30 min。

(4) 酶标仪测定 OD_{595nm} 的数值, 读数并记录, 根据标准品的吸光度在 excel 中制 绘制标准曲线, 将待测样品吸光度数值代入标准曲线公式得到待测样品浓度。

3.3 结果

3.3.1 ASFV I226R 基因克隆以及原核表达质粒构建

根据 NCBI 数据库中 ASFV I226R 基因的 CDS 序列,确定其编码基因片段长约 为 680 bp,将其构建到原核表达载体 pET-30a(图 3-1A-B)。用公司合成的质粒 PCAGGS-HA-I226R 作为模板,PCR 扩增到大小为 680 bp 的目的片段(图 3-1C)。经 过胶回收,过夜酶切、连接、转化涂板之后得到 pET-30a-I226R 重组质粒(图 3-1 D)。 经双酶切鉴定后得到大小为约 5300 bp 和 680 bp 的两条片段,与预期大小一致,表明 目标质粒构建成功。质粒测序显示,与 ASFV 参考株 SY18 株的 I226R 基因 100%同 源,重组质粒成功构建。



图 3-1 I226R 基因克隆以及原核表达质粒构建。

(A-B): pET-30a(+)和 pET-30a-1226R 质粒结构示意图。(C): I226R 基因的 PCR 扩增。M1: DL2000 DNAMarker; 泳道 1: 1226R 基因 PCR 扩增产物。(D): 重组质粒 pET30a-I226R 的双酶切鉴定。 M2: DL5000 DNAMarker; 泳道 1: 空载体 pET-30a 双酶切电泳; 泳道 2: pET-30a-1226R 双酶切电泳。

Figure 3-1 I226R gene cloning and prokaryotic expression plasmid construction.

(A-B): Schematic diagram of the structure of the pET-30a(+) and pET-30a-1226R plasmid. (C): PCR amplification of the I226R gene. M1: DL2000 DNA Marker; Lane 1: 1226R gene gene PCR products. (D): Identification of the pET30a-I226R by double digestion. M2: DL5000 DNA Marker; Lane 1: Empty vector pET-30a double digestion electrophoresis product; Lane 2: pET30a-1226R double digestion electrophoresis product.

3.3.2 ASFV I226R 基因克隆以及真核表达质粒构建

为了研究 ASFV I226R 的生物学功能,以公司合成的质粒作为模板,进行目的基因的 PCR 扩增,将其构建到真核表达载体 pEGFP-N1 上(图 3-2A-B)。

经过胶回收,过夜酶切、连接、转化涂板之后得到 pEGFP-N1-I226R 重组质粒。 经双酶切鉴定后得到大小为约 4700 bp 和 680 bp 的两条片段(图 3-2 D),与预期大小 一致,表明目标质粒构建成功。



图 3-2 I226R 基因克隆以及真核表达质粒构建。

(A-B): pEGFP-N1 和 pEGFP-N1-1226R 质粒结构示意图。(C): I226R 基因的 PCR 扩增。M1: DL2000 DNAMarker; 泳道 1: 1226R 基因 PCR 扩增产物。(D): 重组质粒 pEGFP-N1-I226R 的双酶切鉴定。

M2: DL5000 DNAMarker; 泳道 1: 空载体 pEGFP-N1 双酶切电泳; 泳道 2: pEGFP-N1-1226R 双 酶切电泳;

Figure 3-2 I226R gene cloning and eukaryotic expression plasmid construction.

(A-B): Schematic diagram of the structure of the pEGFP-N1and pEGFP-N1 plasmid. (C): PCR amplification of the I226R gene. M1: DL2000 DNA Marker; Lane 1: 1226R gene gene PCR products. (D): Identification of the pEGFP-N1-I226R by double digestion.; M2: DL5000 DNA Marker; Lane 1: Empty vector pEGFP-N1 double digestion electrophoresis product; Lane 2: pEGFP-N1-1226R double digestion electrophoresis product;

3.3.3 原核表达诱导条件筛选

为了得到高表达量的蛋白,优化蛋白表达的温度和时间条件。把重组质粒 pET30a-I226R 转化感受态细胞 BL-21,利用 IPTG 分别在 16 ℃(图 3-3A)和 37 ℃下 诱导表达(图 3-3B)。SDS -PAGE 鉴定结果显示蛋白在 37 ℃诱导 12 h 的条件下表达 量最高,所表达的产物在 27 kDa 处显示目标条带,表明重组蛋白表达成功。



图 3-3 重组蛋白 I226R 在 16 ℃和 37 ℃条件下诱导表达。

M:蛋白 Marker; (A): 泳道 1: 诱导前的 pET30a-I226R/BL21 样品。泳道 2~7: pET30a-I226R/BL21 在 16 ℃下表达 2~12 h。(B): 泳道 1: 诱导前的 pET30a-I226R/BL21 样品。泳道 2~7: pET-30a-I226R/BL21 在 37 ℃下表达 2~12 h。

Figure 3-3 The recombinant protein I226R was induced expression at 16 °C and 37 °C.

M: protein Marker; (A): Lane 1: pET30a-I226R/BL21 samples before IPTG induction; Lane2-7: The pET30a-I226R/BL21 was induced expression at 16 °C for 2~12 hours; (B): Lane 1: pET30a-I226R/BL21 samples before IPTG induction; Lane2-7: The pET30a-I226R/BL21 was induced expression at 37 °C for 2~12 hours.

3.3.4 重组蛋白表达形式鉴定以及纯化

把重组质粒 pET30a-I226R 转化感受态细胞 BL-21,37 ℃下用 IPTG 对其进行诱导 表达 12 h,以空质粒载体作为阴性对照。将诱导后的菌体收集、离心,超声破碎后用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝鉴定沉淀与上清的表达情况。结果显示,目标蛋白在沉淀中 表达(图 3-4A)。

根据上述优化的最适条件,大量诱导表达重组蛋白,超声裂解菌体后取沉淀,将 沉淀经过 PBS 和 PBST 洗涤之后,用6M 盐酸胍变性液在4℃条件下将其变性过夜。 利用 Ni 柱亲和层析纯化,将洗脱流穿后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析纯化效果,纯化 后的目的条带单一且没有其他杂带,大小在 27 kDa 左右,符合预期,表明目的蛋白纯 化成功(图 3-4B)。BCA 蛋白测定法得到标准曲线(图 3-4C),公式为 y = 1.7043x + 0.0603 (R² = 0.9832),测得样品吸光度为 1.765,因此纯化后的蛋白浓度约为 1 mg/mL。



图 3-4 重组蛋白原核表达 SDS-Page 分析、蛋白纯化以及 BCA 测定。

M:蛋白 Marker; (A): 泳道 1:诱导前的 pET-30a-I226R/BL21 样品;泳道 2:诱导后的 pET-30a-I226R/BL21 样品;泳道 3:在 37℃ 下诱导 12 h 后的 pET-30a-I226R 的上清液;泳道 4:在 37℃ 下诱导 12 h 后的 pET-30a-I226R 的沉淀; (B):泳道 1: SDS-PAGE 分析纯化后的 I226R 蛋 白。(C): BCA 标准曲线

Figure 3-4 Recombinant prokaryotic expression SDS-Page analysis, protein purification, and BCA assay.

M: protein marker; (A): Lane 1: pET-30a-I226R/BL21 samples before IPTG induction; Lane 2 : pET-30a-I226R/BL21 samples after IPTG induction; Lane 3: Supernatant of pET-30a-I226R induced for 12 h at 37 °C; Lane 4: Precipitation of pET-30a-I226R induced for 12 h at 37 °C; (B): Lane 1: SDS-PAGE analysis of purified I226R proteins. (C): BCA standard curve.

3.3.5 重组蛋白的免疫原性和反应原性分析

将浓缩和透析后的蛋白与等量完全或不完全弗氏佐剂乳化后,免疫 6~8 周龄的 BALB/C 小鼠,小鼠按上述免疫程序三免后,收集小鼠的血清,用 ASFV 的阳性血清 (图 3-5A)和得到的多克隆抗体作为一抗(1: 1000)与 ASFV I226R 重组蛋白反应, 进行免疫印迹分析,以此判断多克隆抗体是否有效(图 3-5B)。结果显示在 27 kDa 左右出现条带,符合预期位置,表示重组蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。



图 3-5 重组蛋白 I226R 免疫原性和反应原性。

(A): M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 非洲猪瘟阳性血清; 泳道 2: 阴性血清。(B): 蛋白 Marker;泳道 1: 多克隆抗体阴性血清; 泳道 2: 多克隆抗体阳性血清。

Figure 3-5 Immunogenicity and reactivity analysis results of recombinant protein 1226R. (A): M: protein marker; Lane 1: The ASFV positive serum; Lane 2: The negtive serum. (B): M: protein marker; Lane 1: Polyclonal antibody negative serum; Lane 2: Polyclonal antibody positive serum.

3.3.6 重组蛋白鼠多克隆抗体效价检测结果

利用纯化后的 ASFV I226R 蛋白作为包被抗原,建立的间接 ELISA 方法对小鼠多 克隆抗体效价进行检测(图 3-6),制备的多克隆抗体的稀释度在 1:25600 时,阳性 血清 OD_{450nm} 值仍然大于阴性血清 OD_{450nm} 值 2 倍以上。表明该鼠多克隆抗体具有良好 的效价,效价为 1:25600。



图 3-6.小鼠多克隆抗体效价检测结果

Figure 3-6.Results of titer detection of mouse polyclonal antibody

3.4 讨论

外源的蛋白表达系统,按照宿主不同可以分为真核表达系统和原核表达系统。其中大肠杆菌表达系统是最有效的原核表达系统之一,是表达外源蛋白时的首选。不仅具有操作简单、表达快速、经济实惠的特点,同时还有遗传背景清晰,可选的质粒多,表达蛋白水平高的优势^[169]。因此本章节的研究从不同温度和不同的诱导时间来优化大肠杆菌原核表达系统表达 ASFV 1226R 蛋白的诱导表达条件,最终确定了表达量最高的诱导时间和诱导温度,最大程度获得了最多的重组蛋白量。在纯化过程中利用不同PH 值的 Buffer 洗脱 His 柱上的蛋白,得到了高纯度的目的蛋白。

纯化后的蛋白溶液中含有尿素,因此通过透析置换蛋白的溶剂,得到无尿素的蛋白用于多克隆抗体的制备。透析袋进的原理是蛋白质等生物大分子物质不能通过半透膜,而小分子的盐类可以通过。由于内外的渗透压不同,小分子盐类从渗透压高的一侧移动到低的一侧,使得膜内外渗透压达到平衡状态,以此实现蛋白质与盐的分离。这种方法耗时较长,而超滤法所耗费的时间相对较短,其原理是利用具有一定大小孔径的微孔滤膜,通过加压或减压等方法,使得大分子的物质留在滤膜的上层,而小分子物质则被过滤到下层,从而达到更换溶剂、脱盐的目的。本章研究采用超滤管透析,目的蛋白的大小大约在 27 kDa 左右,选用 10 K 大小的超滤管过滤掉大小为 10 kDa 以下的蛋白,一般进行 10~20 倍换液视为蛋白原有的介质已经被替换掉,以此代替透析袋透析换液,通过 Western blotting 实验检测,重组蛋白具有良好的免疫原性。所制备的多克隆抗体效价高。

3.5 小结

1、成功构建了原核表达质粒 pET-30a-I226R 和真核表达质粒 pEGFP-I226R;

2、利用原核表达系统成功表达了重组蛋白;筛选优化了原核表达时间和温度: 37 ℃表达 12 h;

3、Western blot 检测纯化后的重组蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。

4、成功制备 ASFV I226R 的鼠源多克隆抗体,效价为 1: 25600;

第四章 间接 ELISA 方法的建立

ASF 是一种急性、发热性的高度传染性疾病,我国将其列为一类疫病。ASF 疫情 给我国的食品安全和市场稳定带来巨大冲击,而目前尚未有针对 ASFV 的安全有效疫 苗或药物进行疫情防控,早期预防诊断和抗体监测是疫情防控的重要手段。此外,患 病猪的临床症状与其他病毒引起的疾病有很大相似之处,因此单凭临床诊断不能准确 判断,需要借助实验室技术作为诊断的依据。间接 ELISA 是目前 ASFV 血清学检测中 应用最广泛的诊断方法,具有高通量的特点,可同时检测大量的临床血清样本,具有 高度的特异性和敏感性,且操作简便、设备简单。

ASFV 的基因组是线性的双链 DNA 分子,两端共价闭合,长度大约是 170 kb~190 kb,含有 150~167 个开放阅读框,编码 150~200 多种蛋白质^[25]。I226R 是 ASFV 的非结构蛋白,在 ASFV 的整个感染周期均能检测到。本章节利用上一章节中原核 表达并纯化的 ASFV I226R 重组蛋白作为包被抗原,建立间接 ELISA 检测方法。并对 反应条件进行优化,收集临床血清样品作检测,测试间接 ELISA 方法的特异性和灵敏 性,为临床检测 ASFV 抗体提供支撑,也为区分 I226R 基因缺失疫苗株和自然感染株 打下基础。

4.1 材料

4.1.1 主要试剂

试剂名称	公司名称
TMB 显色液	碧云天生物技术有限公司
HRP 标记羊抗猪 IgG	Abcam 公司
脱脂奶粉	内蒙古伊利实业集团股份有限公司
血清白蛋白(BSA)	北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司
96 孔酶标板	贝兰伯(Bioland)生物技术(杭州)有限公司

4.1.2 主要仪器

仪器名称	公司厂家名称
微量移液器	艾本德 Eppendorf
37 摄氏度恒温培养箱	上海浦东跃新科学仪器厂
酶标仪	美国 BIORAD 公司
冰箱	中科美菱

4.1.3 主要试剂的配方

所使用的分析纯均为国产常用分析纯。

(1) PBS	1 L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.63 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
(2)洗涤液 PBST (PH=7.4)	1 L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.63 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
0.05% Tween-20	500 μL
(3)终止液(2 M H ₂ SO ₄)	100 mL
往 178.3 mL 蒸馏水中,缓慢逐滴加)	入21.7 mL的浓硫酸(98%)
(4) 包被缓冲液	1 L(0.05 M 碳酸盐缓冲液, PH=9.6)
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
加 ddH2O 至 1 L	

4.1.4 血清

猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪流行性腹泻病毒(PEDV)临床阳性血清和ASFV阴性血清,均由本实验室保存;经灭活处理的ASFV阳性血清为XXX研究所馈赠。

4.2 方法

4.2.1 确定最佳抗原蛋白包被浓度和血清稀释度

(1)用 PH = 9.6,浓度为 0.05 M 碳酸盐包被缓冲液将纯化后的原核表达蛋白
 I226R 稀释为 1、2、4 及 8 μg/mL, 100 μL/孔分别包被酶标板,置于 4 ℃过夜包被。

(2)用 PBST 溶液洗涤酶标板 3 次,每次 3~5 min。加入 200 μL/孔的新鲜配制的 封闭液,4℃封闭过夜,用 200 μL PBST 洗涤 3 次,每次 3~5 min;

(3)尽量甩干酶标板,阴性、阳性血清的稀释比例为 1: 20、1: 40、1: 80、1: 160、1: 320,每孔加入 100 µL 稀释后的血清,37 ℃解育 1 h 30 min; PBST 洗涤 3 次,尽量甩干酶标板;

(4) 按 100 μL/孔加入 1:8000 稀释好的羊抗猪二抗,37 ℃ 孵育 45 min,洗涤 5 次;

(5) 尽量甩干酶标板, 按照 100 µL/孔加入 TMB 显色液, 37 ℃避光反应 15 min;

(6)取出板子,按 100 μL/孔加入 2 M 硫酸终止液终止显色,于酶标仪检测 OD_{450nm}值,所得阳性血清 OD_{450nm}值为 P 值,阴性血清 OD_{450nm}值为 N 值。计算相应 的 P/N 值, P/N 的值最大且 OD_{450nm}值接近 1,有抗原最佳包被浓度及最佳阳性血清稀 释度。

4.2.2 封闭条件的优化

在上一步确定的包被浓度和血清稀释度的条件下,采用棋盘法,分别在4℃×12h、 37℃×2h和37℃×1h等不同条件下分别用1%BSA溶液、3%BSA溶液、5%BSA 溶液和5%脱脂奶粉进行酶标板的封闭。

4.2.3 二抗稀释度的优化

(1)依照最佳抗原包被浓度、最佳血清稀释度和最佳封闭条件,加入一抗,37 ℃ 孵育1h30min,弃掉一抗用 PBST 洗涤三次;

(2) 弃掉封闭液,用 PBST 洗涤三次;

(3)用 PBST 稀释 HRP 标记的二抗,设计 5 个稀释倍数: 1: 2000; 1: 4000; 1: 8000; 1: 10000,分别按照 100 µL/孔加入酶标板孔中,每个稀释度设计 3 个重复,在 37 ℃恒温箱内反应 45 min,弃掉 HRP 标记的二抗用 PBST 洗涤三次;

(4) 按照 ELISA 的实验步骤,加入 TMB 显色液 100 μL/孔,避光在 37 ℃条件下 反应 15 min,取出立即加入等体积的终止液(2 M H₂SO4)。

(5)用酶标仪测定 OD450nm 的值。

4.2.4 二抗反应时间的优化

(1)依照最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度、最佳封闭酶标板的条件,加入一抗,37℃孵育1h30min,弃掉一抗用PBST洗涤三次;

(2) 封闭完后,弃掉封闭液,用 PBST 洗涤三次;

(3)按照上一步优化的最佳二抗稀释度,用 PBST 稀释二抗,按照 100 μL/孔加 入酶标板孔中,每个稀释度设计 3 个重复;

(4)设计三个不同的二抗反应时间: 37°C恒温箱内反应 30 min、45 min、60 min、90 min;

(5)弃掉 HRP 标记的二抗,用 PBST 洗涤酶标板 3~5 次,加入 TMB 显色液 100 μL/孔,避光在 37 ℃条件下反应 15 min,取出立即加入等体积的 100 μL/孔终止液(2 M H₂SO₄)。

(6)用酶标仪测定并读取 OD450nm 值。

4.2.5 间接 ELISA 方法阴阳性临界值的确定

使用优化后的间接 ELISA 方法检测己知的 20 份 ASFV 阴性血清,计算吸光值的 平均值 \bar{X} 和标准差 SD,根据统计学原理判断样品是否为阳性或阴性。如果样品 OD_{450nm} $\geq \bar{X}$ +3SD,则判定为阳性;反之则判定为阴性。

4.2.6 特异性试验

为了检验所建立方法的特异性,用所建立的 ELISA 方法,根据上一步确定的阴阳

性临界值,对 PRRSV 阳性血清、CSFV 阳性血清、PRV 阳性血清、PEDV 阳性血清、ASFV 阳性血清和 ASFV 阴性血清进行检测和判定结果。

4.2.7 灵敏性试验

在 96 孔板中加入 1:10 稀释的标准 ASFV 阳性猪血清,此后开始 3 倍倍比稀释,利用上述优化的间接 ELISA 方法检测,根据所得到的阴阳性临界值判定检测结果,当首次出现阳性血清的 OD_{450nm} 值小于临界值,此时稀释度的前一个稀释度,判定为阳性血清的最大稀释度。

4.2.8 重复性试验

用同一批次包被的酶标板对相同的临床血清进行检测,做批内重复性实验,用不同批次包被抗原的酶标板对相同的临床血清进行检测,做批间重复性实验,每份血清做均3次重复。

4.2.9 临床应用及其与进口试剂盒的符合率验证

利用本章节中建立的间接 ELISA 方法与进口间接 ELSIA 试剂盒(ID.Vet 公司, ID Screen® African Swine Fever Indirect ELISA kit),对收集到的 60 份猪血清进行检测,比较两种方法的符合率。

4.3 结果

4.3.1 最佳抗原蛋白包被浓度和血清稀释度

以原核表达纯化的 ASFV 重组蛋白 I226R 为抗原,建立间接 ELISA 的方法对收集 的临床血清样品进行检测。采用方阵滴定的方法,梯度设置抗原包被浓度和血清稀释 度,得到当抗原包被浓度为 4 µg/mL,血清稀释度为 1:160 时(表 4-1 中灰色背景标 出),此时阳性 OD450nm 值为 1.11,数值接近于 1;阴性血清 OD450nm 值较小,且 P/N 值最大。因此得到最佳抗原包被浓度为 4 µg/mL,血清稀释度为 1:160。

表 4-1 不同抗原包被浓度下的 OD450nm 值

P: 阳性血清 OD_{450nm} 值; N: 阴性血清 OD_{450nm} 值

Table 4-1 OD_{450nm} values at different antigen coating concentrations

P: positive serum OD_{450 nm} value; N: Negative serum OD_{450nm} value

抗原包 被浓度 —		1:20			1:40			1:80			1:160			1:320	1
µg/mL	Р	Ν	P/N	Р	Ν	P/N	Р	Ν	P/N	Р	Ν	P/N	Р	N	P/N
8	1.67	0.22	7.59	1.56	0.18	8.67	1.45	0.18	8.05	1.22	0.16	7.62	0.89	0.16	5.56
4	1.55	0.18	8.61	1.45	0.16	9.06	1.31	0.16	8.19	1.11	0.11	10.09	0.75	0.11	6.82
2	1.41	0.16	8.81	1.32	0.14	9.43	1.21	0.14	8.64	0.89	0.11	8.09	0.65	0.12	5.42
1	1.28	0.15	8.53	1.19	0.13	9.15	1.09	0.13	8.38	0.71	0.12	5.92	0.44	0.11	4.00

4.3.2 封闭温度和时间的优化

按上述条件继续进行封闭温度和时间的筛选,设计 3 个不同的封闭时间,分别为 4 ℃ 12 h, 37 ℃ 2 h 以及 37 ℃ 1 h,进行常规间接 ELISA 操作,根据 P/N 值的大小 确定封闭温度和封闭时间。根据表 4-2 确定封闭条件为:5% BSA,4℃封闭 12 h (表 中灰色背景标出),此时 P/N 值最大。由此确定该条件为最佳封闭温度和时间。

表 4-2 封闭温度和时间的确定

Table 4-2 Determination of sealing temperature and time

封闭迹	血達	4 °C	•°C 12 h 37 °C		4 °C 12 h 37 °C 2 h		3	37 °C 1 h		
到内视	Ⅲ.们	OD _{450nm}	P/N	OD _{450nm}	P/N	OD _{450nm}	P/N			
1%BSA	阳性	1.22	9714	1.23	0.000	1.25	8.030			
	阴性	0.14	8.714	0.15	8.200	0.14	8.929			
3%BSA	阳性	1.20	0.221	1.33	10 221	1.22	10 167			
	阴性	0.13	9.231	0.13	10.231	0.12	10.107			
5%BSA	阳性	1.19	10 919	1.21	0.208	1.12	10 192			
	阴性	0.11	10.010	0.13	9.308	0.11	10.162			
5%脱脂	阳性	1.13	0 /17	1.29	0 073	1.21	10.083			
奶	阴性	0.12	7.41/	0.13	7.725	0.12	10.085			

4.3.3 二抗稀释度的优化

依照最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度、最佳封闭酶标板的条件,设计二抗的稀释度为:1:2000、1:4000、1:6000、1:8000、1:10000,如图 4-1 所示,当酶标二抗稀释度为 1:8000 时,I226R-ELISA 的 P/N 值最大。因此最佳二抗稀释度为 1:8000。





Figure 4-1 Optimization of secondary antibody dilution

4.3.4 二抗反应时间的优化

二抗按上述优化的最佳稀释度稀释,设计4个酶标二抗反应时间37℃作用30min、 37℃作用45min、37℃作用60min、37℃作用90min,间接ELISA的结果显示,如 图4-2,当二抗的反应时间为60min时,I226R-ELISA的P/N值最大。



图 4-2 二抗最佳反应时间的确定

Figure 4-2 Determination of optimal reaction time of secondary antibodies 4.3.5 间接 ELISA 方法阴阳性临界值的确定

根据抗原包被浓度为 4 µg/mL,血清稀释度为 1:160,以及所确定的各项最优条件的间接 ELISA 方法来检测 20 份 ASFV 阴性血清,每份血清做三个重复。经酶标仪测定吸光值后,结果显示 OD_{450nm} 值介于 0.11~0.26 之间(表 4-3),计算平均数 $\overline{X} = 0.136$ 和标准差 SD= 0.049,根据临界值的计算公式=阴性血清样品 OD_{450nm} 平均值+3×阴性血清样品标准差计算相应的临界值计算出阴阳临界值为 \overline{X} +3SD=0.284。因此待检样品的OD_{450nm} 值 \geq 0.284 时,判定为阳性,反之则判定为阴性。

		0			
血清编号	OD450n	m均值			
Serum number					
1-5	0.253	0.135	0.147	0.152	0.095
6-10	0.123	0.181	0.152	0.173	0.132
11-15	0.091	0.071	0.049	0.157	0.167
16-20	0.052	0.148	0.129	0.198	0.114

表 4-3 20 份阴性血清检测结果

Table 4-3 Detection results of 20 negative serum

4.3.6 特异性试验结果

用所建立、优化的间接 ELISA 抗体检测方法对 PRRSV、CSFV、PRV 以及 PEDV 的阳性猪血清和 ASFV 的阴性血清进行检测,每个样品均重复三次。以此评价该 ELISA 检测方法的特异性。结果如下:所有样品的 OD_{450nm} 值都小于所确定的临界值 0.284(表 4-4),因此判定为 ASFV 阴性。表示建立的间接 ELISA 方法在检测易混淆的阳性血 清时具有良好的特异性。

表 4-4 特异性试验结果

Table 4-4 Specificity test results

血清样品	阴性对照	阳性对照	PRRSV	CSFV	PRV	PEDV
OD450nm ($\overline{X}\pm s$)	0.123±0.112	1.207±0.083	0.156±0.007	0.172±0.049	0.007±0.014	0.107±0.008

4.3.7 灵敏性试验结果

每个样品重复三次并计算其平均值和标准差 (X±s),结果显示 (表 4-5),当阳性血清稀释度为 1:7290,所检测的标准阳性血清的 OD_{450nm} 值首次小于临界值 0.284,因此 1:2430 是检测 ASFV 阳性血清的最大稀释度,表明该方法能够检测 ASFV 阳性血清的最大稀释度为 1:2430,具有较好的灵敏性。

表 4-5 灵敏性试验结果

Table 4-5 Sensitivity test results

血清 稀释 度	1: 10	1: 30	1: 90	1: 270	1: 810	1: 2430	1: 7290
标准 阴性	0.211±0.022	0.195±0.021	0.175±0.046	0.145±0.013	0.122±0.008	0.078±0.080	0.014±0.007
样品 标准							
阳性	3.424±0.161	2.678±0.121	2.539±0.136	0.733±0.049	0.536±0.078	0.324±0.013	0.023±0.008
样品							

4.3.8 重复性试验结果

分别随机抽取 3 组同批次包被的酶标板检测 6 份已知的 ASFV 阴阳性血清(3 份 阳性 3 份阴性),每个血清三个重复,酶标仪读取 OD_{450nm}值,计算其变异系数(CV), CV=(标准偏差 SD / 平均值 \overline{X})×100%,结果显示变异系数在 0.7%~7.7%之间(表 4-6),均小于 10%,因此批内重复性较好。

血清编号	<u>.</u>				平均值 \overline{X}	标准差 SD	变异系数 CV(%)
	1	1.418	1.435	1.441	1.431	0.010	0.833
阳性血清	2	1.271	1.248	1.263	1.261	0.010	0.926
	3	1.168	1.065	1.234	1.156	0.070	7.37
	1	0.112	0.113	0.111	0.112	0.001	0.892
阴性血清	2	0.063	0.066	0.073	0.067	0.005	7.621
	3	0.991	0.977	0.983	0.984	0.007	0.714

表 4-6 批内重复性结果 Table 4-6 Intra batch repeatability results

随机抽取3组不同批次包被的酶标板检测己知的ASFV 阴、阳性血清各3份,每个血清做3个重复,酶标仪读取OD450nm值,结果显示变异系数在0.8%~8.0%之间(表4-7),均小于10%,说明所建立的ELISA 方法有较好的批间重复性。

表 4-7 批间重复性结果

Table 4-7 Inter batch repeatability results

	血清编号	各 批	酶 标 板	编号	平均值	标准差	变异系数
		1	2	3	\overline{X}	SD	CV(%)
	1	1.224	1.198	1.211	1.211	0.013	1.073
阳 性	2	1.067	1.056	1.074	1.066	0.009	0.851
	3	1.155	1.109	1.003	1.089	0.078	7.158
阴 性	1	0.161	0.148	0.168	0.159	0.010	6.383
	2	0.217	0.185	0.201	0.201	0.016	7.960
	3	0.098	0.111	0.161	0.102	0.007	7.046

4.3.9 间接 ELISA 方法与进口试剂盒的符合率验证

应用建立的间接 ELISA 方法对 60 份猪血清样品进行检测,检测出阳性样品 12 份,检测出阴性样品 48 份。进口试剂盒(ID.Vet 公司)检测出阳性样品 9 份,检测 出阴性样品 51 份。这两种方法检测结果均为阳性的样品 9 份,检测结果均为阴性的样 品 48 份。与商品化的间接 ELISA 方法比较,本方法的特异性为 100%(45/45),敏 感性为 75%(9/12),本方法与商品化试剂盒之间的符合率为 90%(54/60)(表 4-8)。

		0		
检测方注			进口试剂盒	
100100170170		阳性	阴性	总计
	阳性	9	0	9
间接 ELISA	阴性	3	45	48
	总计	12	45	60

表 4-8 间接 ELISA 试剂盒诊断比较 Table 4-8 Comparison of indirect ELISA kit diagnosis

4.4 讨论

病原学检测包括病毒分离和核酸检测,都是针对病原体本身的检测,能有效诊断 潜伏期、急性期或病程初期感染的 AFSV。感染 ASFV 后,一般 7~10 天内体内产生抗 体,因此相比血清学检测而言,病原学检测更能快速地检测到病原体,为提前掌握临 床感染情况提供依据。2020 年我国报道了猪体内自然致弱的 ASFV 分离株,当猪感染 弱毒或低毒力毒株时,病原学检测无法满足检测需要,因此低毒力天然突变体的出现 给早期预防诊断 ASF 造成了更大的困难^[170]。这时候血清学检测是一个很好的选择, 也就意味着开发高灵敏性和高特异性的诊断方法十分必要。

血清学诊断方法的优势在于操作简单、成本低、能大批量地检测样品。由于目前 没有针对 ASFV 获批上市的疫苗,存在 ASFV 抗体的情况下,即表明发生了病毒感染, OIE 推荐基于 ASFV 抗体检测的 ELISA 方法:首先利用间接 ELISA 方法进行筛选, 其次结合免疫印迹实验(IBT)或间接免疫荧光技术(IFA)确定(OIE, 2017)。

目前,开发非洲猪瘟抗体检测 ELISA 试剂盒的公司主要有:西班牙 INGENSA 和 法国 ID-Vet。其中应用最为广泛的是西班牙 INGEASA 公司的 INGEZIM PPA COMPAC competition-ELISA 试剂盒^[121]。西班牙 INGENSA 公司建立了一种阻断 ELISA 的方法,基于 ASFV 的主要结构蛋白 p72 和针对该蛋白的单克隆抗体研制而成;而法国 ID-Vet 公司的两种试剂盒分别是利用了间接 ELISA 方法和阻断 ELISA 方法,所涉及的病毒 蛋白有 p72、p30 和 pp62。

本章研究利用所表达纯化的 ASFV I226R 蛋白作为包被抗原,用 PH = 9.6 的碳酸 盐缓冲液进行包被,建立了检测血清抗体的间接 ELISA 方法。优化了 ELISA 方法的 条件,确定了最佳抗原包被浓度、血清稀释度、封闭温度和时间、二抗的反应时间、 二抗的稀释度;通过检测 20 份临床 ASFV 阴性血清,确定了 I226R-ELISA 方法的阴 阳性临界值;通过检测 PEDV、PRRSV、CSFV、PRV 阳性血清,确定了 I226R-ELISA 方法的特异性良好;通过随机检测不同批次和同一批次包被的酶标板,结果显示变异

系数均小于 10%,因此所建立的方法具有很好的重复性。在优化后的条件下,检测该方法的灵敏性,结果显示,ASFV 阳性血清的最大稀释度为 1:2430,表示具有良好的灵敏性。

本章所建立的检测非洲猪瘟的抗体的间接 ELISA 方法,能够筛查、掌握感染后存 活的动物情况,为检测临床的 ASFV 感染情况作数据支撑;对疾病的流行特征研究、 发现天然 ASFV 弱毒株以及根除和净化 ASFV 有重要意义^[87]。通过检测临床症状和病 理变化与 ASFV 相似的病毒,例如经典猪瘟病毒,表明所建立的间接 ELISA 方法有较 高的特异性,能够区分临床表现相似、相近的病毒感染。

4.5 小结

1、以原核表达的 I226R 蛋白为包被抗原,建立了检测 ASFV 血清抗体的间接 ELISA 方法,优化了 ELISA 的条件;

2、最佳抗原蛋白包被浓度4µg/mL,血清稀释度为1:160;

3、最佳封闭条件为闭条件为 5% BSA, 4 ℃反应 12 h;

4、最佳二抗稀释度为1:8000;最佳二抗反应时间为60min;

5、确定了阴阳性临界值:待检样品的 OD_{450nm}值 ≥0.284 时,判定为 ASFV 阳性; OD_{450nm} < 0.284 值则判定为阴性。所建立的间接 ELISA 有良好的特异性、灵敏性和重 复性。

第五章 全文结论

1、通过双荧光素酶报告基因系统和荧光定量 PCR 实验,得到 pI226R 抑制 cGAS-STING 介导的I型干扰素的激活,通过免疫印迹分析进一步确认 pI226R 对 cGAS-STING 信号通路下游蛋白 TBK1 和 IRF3 的磷酸化有抑制作用。

2、通过免疫共沉淀实验和免疫印迹分析实验,发现 pI226R 靶向 cGAS 相互作用 并对其降解,这种降解作用是通过自噬-溶酶体途径; pI226R 与 cGAS 的相互作用减弱 了 cGAS 与其 E3 连接酶 TRIM56 的结合,并抑制 TRIM56 介导的 cGAS 单泛素化。

3、成功构建了原核表达质粒 pET-30a-I226R 和真核表达质粒 pEGFP-I226R,利用 大肠杆菌原核表达系统得到了表达量高的重组蛋白。

4、对重组蛋白 I226R 进行纯化、浓缩和透析,并制备了相应的鼠源多克隆抗体,效价为 1: 25600。

5、以原核表达的I226R蛋白为包被抗原,建立了检测ASFV血清抗体的间接ELISA 方法,优化了ELISA的条件;所建立的间接ELISA有良好的特异性、灵敏性和重复 性。

参考文献

- [1] 李大华. 非洲猪瘟病毒 p72 蛋白单克隆抗体的制备[D]. 河南农业大学, 2022.
- [2] Blome S, Gabriel C, Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar[J]. VIRUS RES. 2013, 173(1): 122-130.
- [3] 张凯. 非洲猪瘟病毒 p22 蛋白表达及其 iELISA 检测方法建立[D]. 山东农业大学, 2022.
- [4] Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B. African swine fever (ASF): five years around Europe[J]. VET MICROBIOL. 2013, 165(1-2): 45-50.
- [5] Martínez-López B, Perez AM, Feliziani F, et al. Evaluation of the risk factors contributing to the African swine fever occurrence in Sardinia, Italy[J]. FRONT MICROBIOL. 2015, 6: 314.
- [6] 王述超, 张守峰, 扈荣良. 非洲猪瘟流行病学与媒介钝蜱研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报. 2019, 26(04): 269-276.
- [7] Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Carrasco L, et al. Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus[J]. J COMP PATHOL. 1998, 118(1): 1-13.
- [8] Villeda CJ, Williams SM, Wilkinson PJ, et al. Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78)[J]. ARCH VIROL. 1993, 130(1-2): 71-83.
- [9] Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, et al. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever[J]. J COMP PATHOL. 2015, 152(1): 9-21.
- [10] Sánchez-Cordón PJ, Montoya M, Reis AL, et al. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry[J]. VET J. 2018, 233: 41-48.
- [11] Eustace Montgomery R. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony)[J]. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics. 1921, 34: 159-191.
- [12] Bastos AD, Penrith ML, Crucière C, et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation[J]. ARCH VIROL. 2003, 148(4): 693-706.
- [13] Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, et al. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2018, 65(2): 420-431.
- [14] Penrith ML, Vosloo W. Review of African swine fever: transmission, spread and control[J]. J S AFR VET ASSOC. 2009, 80(2): 58-62.
- [15] Dixon LK, Sun H, Roberts H. African swine fever[J]. Antiviral Res. 2019, 165: 34-41.
- [16] Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007[J]. EMERG INFECT DIS. 2008, 14(12): 1870-1874.
- [17] Costard S, Mur L, Lubroth J, et al. Epidemiology of African swine fever virus[J]. VIRUS RES. 2013, 173(1): 191-197.
- [18] Golnar AJ, Martin E, Wormington JD, et al. Reviewing the Potential Vectors and Hosts of African Swine Fever Virus Transmission in the United States[J]. Vector Borne Zoonotic Dis. 2019, 19(7): 512-524.
- [19] Jori F, Bastos AD. Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever[J]. ECOHEALTH. 2009, 6(2): 296-310.
- [20] Haresnape JM, Mamu FD. The distribution of ticks of the Ornithodoros moubata complex (Ixodoidea: Argasidae) in Malawi, and its relation to African swine fever epizootiology[J]. J Hyg (Lond). 1986, 96(3): 535-544.
- [21] Haresnape JM, Wilkinson PJ. A study of African swine fever virus infected ticks (Ornithodoros moubata) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in

domestic pigs[J]. EPIDEMIOL INFECT. 1989, 102(3): 507-522.

- [22] Haresnape JM, Wilkinson PJ, Mellor PS. Isolation of African swine fever virus from ticks of the Ornithodoros moubata complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi[J]. EPIDEMIOL INFECT. 1988, 101(1): 173-185.
- [23] Chenais E, Ståhl K, Guberti V, et al. Identification of Wild Boar-Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic[J]. EMERG INFECT DIS. 2018, 24(4): 810-812.
- [24] Kleiboeker SB, Scoles GA. Pathogenesis of African swine fever virus in Ornithodoros ticks[J]. ANIM HEALTH RES REV. 2001, 2(2): 121-128.
- [25] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. SCIENCE. 2019, 366(6465): 640-644.
- [26] Andrés G, Charro D, Matamoros T, et al. The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes[M]. 2020: 1-12.
- [27] Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis[J]. VIRUS RES. 2013, 173(1): 29-41.
- [28] Chapman D, Tcherepanov V, Upton C, et al. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates[J]. J GEN VIROL. 2008, 89(Pt 2): 397-408.
- [29] Portugal R, Coelho J, Höper D, et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis[J]. J GEN VIROL. 2015, 96(Pt 2): 408-419.
- [30] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle[J]. J VIROL. 2018, 92(23).
- [31] Liu S, Luo Y, Wang Y, et al. Cryo-EM Structure of the African Swine Fever Virus[J]. CELL HOST MICROBE. 2019, 26(6): 836-843.
- [32] Dixon LK, Chapman DA, Netherton CL, et al. African swine fever virus replication and genomics[J]. VIRUS RES. 2013, 173(1): 3-14.
- [33] Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, et al. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus[J]. Front Vet Sci. 2020, 7: 215.
- [34] Sánchez-Torres C, Gómez-Puertas P, Gómez-del-Moral M, et al. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection[J]. ARCH VIROL. 2003, 148(12): 2307-2323.
- [35] Popescu L, Gaudreault NN, Whitworth KM, et al. Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1[J]. VIROLOGY. 2017, 501: 102-106.
- [36] Galindo I, Cuesta-Geijo MA, Hlavova K, et al. African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis[J]. VIRUS RES. 2015, 200: 45-55.
- [37] Andrés G. African Swine Fever Virus Gets Undressed: New Insights on the Entry Pathway[J]. J VIROL. 2017, 91(4).
- [38] Galindo I, Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review[J]. Viruses. 2017, 9(5).
- [39] Cackett G, Matelska D, Sýkora M, et al. The African Swine Fever Virus Transcriptome[J]. J VIROL. 2020, 94(9).
- [40] Du X, Gao ZQ, Geng Z, et al. Structure and Biochemical Characteristic of the Methyltransferase (MTase) Domain of RNA Capping Enzyme from African Swine Fever Virus[J]. J VIROL. 2021, 95(5).
- [41] Frouco G, Freitas FB, Martins C, et al. Sodium phenylbutyrate abrogates African swine fever virus replication by disrupting the virus-induced hypoacetylation status of histone H3K9/K14[J]. VIRUS RES. 2017, 242: 24-29.
- [42] Jouvenet N, Monaghan P, Way M, et al. Transport of African swine fever virus from assembly sites to the

plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin[J]. J VIROL. 2004, 78(15): 7990-8001.

- [43] Goatley LC, Dixon LK. Processing and localization of the african swine fever virus CD2v transmembrane protein[J]. J VIROL. 2011, 85(7): 3294-3305.
- [44] Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems[J]. Vet Immunol Immunopathol. 2004, 100(3-4): 117-134.
- [45] Galindo I, Almazán F, Bustos MJ, 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] Andrés G, Charro D, Matamoros T, et al. The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes[J]. J BIOL CHEM. 2020, 295(1): 1-12.
- [47] 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]. Appl Microbiol Biotechnol. 2022, 106(7): 2703-2714.
- [48] Caixia W, Songyin Q, Ying X, et al. Development of a Blocking ELISA Kit for Detection of ASFV Antibody Based on a Monoclonal Antibody Against Full-Length p72[J]. J AOAC INT. 2022, 105(5): 1428-1436.
- [49] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt JA. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches[J]. ADV VIRUS RES. 2018, 100: 41-74.
- [50] Angulo A, Viñuela E, Alcamí A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12[J]. J VIROL. 1993, 67(9): 5463-5471.
- [51] Wang Y, Kang W, Yang W, et al. Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review[J]. FRONT IMMUNOL. 2021, 12: 715582.
- [52] Li D, Yang W, Li L, et al. African Swine Fever Virus MGF-505-7R Negatively Regulates cGAS-STING-Mediated Signaling Pathway[J]. J IMMUNOL. 2021, 206(8): 1844-1857.
- [53] Li D, Zhang J, Yang W, et al. African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling[J]. J BIOL CHEM. 2021, 297(5): 101190.
- [54] Yang K, Huang Q, Wang R, et al. African swine fever virus MGF505-11R inhibits type I interferon production by negatively regulating the cGAS-STING-mediated signaling pathway[J]. VET MICROBIOL. 2021, 263: 109265.
- [55] Correia S, Ventura S, Parkhouse RM. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV[J]. VIRUS RES. 2013, 173(1): 87-100.
- [56] Zhuo Y, Guo Z, Ba T, et al. African Swine Fever Virus MGF360-12L Inhibits Type I Interferon Production by Blocking the Interaction of Importin α and NF- κ B Signaling Pathway[J]. VIROL SIN. 2021, 36(2): 176-186.
- [57] Zsak L, Caler E, Lu Z, et al. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine[J]. J VIROL. 1998, 72(2): 1028-1035.
- [58] O'Donnell V, Risatti GR, Holinka LG, et al. Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge[J]. J VIROL. 2017, 91(1).
- [59] García-Belmonte R, Pérez-Núñez D, Pittau M, et al. African Swine Fever Virus Armenia/07 Virulent Strain Controls Interferon Beta Production through the cGAS-STING Pathway[J]. J VIROL. 2019, 93(12).
- [60] Wang X, Wu J, Wu Y, et al. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV

China 2018/1[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2018, 506(3): 437-443.

- [61] Bulimo WD, Miskin JE, Dixon LK. An ARID family protein binds to the African swine fever virus encoded ubiquitin conjugating enzyme, UBCv1[J]. FEBS LETT. 2000, 471(1): 17-22.
- [62] Freitas FB, Frouco G, Martins C, et al. African swine fever virus encodes for an E2-ubiquitin conjugating enzyme that is mono- and di-ubiquitinated and required for viral replication cycle[J]. Sci Rep. 2018, 8(1): 3471.
- [63] Hingamp PM, Arnold JE, Mayer RJ, et al. A ubiquitin conjugating enzyme encoded by African swine fever virus[J]. EMBO J. 1992, 11(1): 361-366.
- [64] Hingamp PM, Leyland ML, Webb J, et al. Characterization of a ubiquitinated protein which is externally located in African swine fever virions[J]. J VIROL. 1995, 69(3): 1785-1793.
- [65] Barrado-Gil L, Del PA, Muñoz-Moreno R, et al. African Swine Fever Virus Ubiquitin-Conjugating Enzyme Interacts With Host Translation Machinery to Regulate the Host Protein Synthesis[J]. FRONT MICROBIOL. 2020, 11: 622907.
- [66] Huang L, Xu W, Liu H, et al. African Swine Fever Virus pI215L Negatively Regulates cGAS-STING Signaling Pathway through Recruiting RNF138 to Inhibit K63-Linked Ubiquitination of TBK1[J]. J IMMUNOL. 2021, 207(11): 2754-2769.
- [67] Li L, Fu J, Li J, et al. African Swine Fever Virus pI215L Inhibits Type I Interferon Signaling by Targeting Interferon Regulatory Factor 9 for Autophagic Degradation[J]. J VIROL. 2022, 96(17): e94422.
- [68] de Oliveira VL, Almeida SC, Soares HR, et al. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV)[J]. ARCH VIROL. 2011, 156(4): 597-609.
- [69] Mukherjee S, Huda S, Sinha BS. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review[J]. SCAND J IMMUNOL. 2019, 90(1): e12771.
- [70] Liu H, Zhu Z, Feng T, et al. African Swine Fever Virus E120R Protein Inhibits Interferon Beta Production by Interacting with IRF3 To Block Its Activation[J]. J VIROL. 2021, 95(18): e82421.
- [71] Yang J, Li S, Feng T, et al. African Swine Fever Virus F317L Protein Inhibits NF- κ B Activation To Evade Host Immune Response and Promote Viral Replication[J]. MSPHERE. 2021, 6(5): e65821.
- [72] Cui S, Wang Y, Gao X, et al. African swine fever virus M1249L protein antagonizes type I interferon production via suppressing phosphorylation of TBK1 and degrading IRF3[J]. VIRUS RES. 2022, 319: 198872.
- [73] Dixon LK, Sánchez-Cordón PJ, Galindo I, et al. Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis[J]. Viruses. 2017, 9(9).
- [74] Nogal ML, González DBG, Rodríguez C, et al. African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells[J]. J VIROL. 2001, 75(6): 2535-2543.
- [75] Banjara S, Caria S, Dixon LK, et al. Structural Insight into African Swine Fever Virus A179L-Mediated Inhibition of Apoptosis[J]. J VIROL. 2017, 91(6).
- [76] Galindo I, Hernaez B, Díaz-Gil G, et al. A179L, a viral Bcl-2 homologue, targets the core Bcl-2 apoptotic machinery and its upstream BH3 activators with selective binding restrictions for Bid and Noxa[J]. VIROLOGY. 2008, 375(2): 561-572.
- [77] Hernaez B, Cabezas M, Muñoz-Moreno R, et al. A179L, a new viral Bcl2 homolog targeting Beclin 1 autophagy related protein[J]. CURR MOL MED. 2013, 13(2): 305-316.
- [78] Zhang F, Moon A, Childs K, et al. The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2alpha and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection[J]. J VIROL. 2010, 84(20): 10681-10689.
- [79] Zsak L, Lu Z, Kutish GF, et al. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene[J]. J VIROL. 1996, 70(12): 8865-8871.

- [80] Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, et al. Differential Effect of the Deletion of African Swine Fever Virus Virulence-Associated Genes in the Induction of Attenuation of the Highly Virulent Georgia Strain[J]. Viruses. 2019, 11(7).
- [81] Afonso CL, Zsak L, Carrillo C, et al. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence[J]. J GEN VIROL. 1998, 79 (Pt 10): 2543-2547.
- [82] Hurtado C, Granja AG, Bustos MJ, et al. The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression[J]. VIROLOGY. 2004, 326(1): 160-170.
- [83] Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, et al. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines[J]. Vet Immunol Immunopathol. 2002, 90(1-2): 11-22.
- [84] Carrasco L, Núñez A, Salguero FJ, et al. African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages[J]. J COMP PATHOL. 2002, 126(2-3): 194-201.
- [85] Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples[J]. Curr Protoc Cell Biol. 2011, Chapter 26: 14-26.
- [86] MALMQUIST WA, HAY D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures[J]. AM J VET RES. 1960, 21: 104-108.
- [87] Gallardo C, Soler A, Rodze I, et al. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2019, 66(3): 1399-1404.
- [88] 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]. J GEN VIROL. 2001, 82(Pt 3): 513-523.
- [89] Gonzague M, Roger F, Bastos A, et al. Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar[J]. EPIDEMIOL INFECT. 2001, 126(3): 453-459.
- [90] Agüero M, Fernández J, Romero L, et al. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples[J]. J CLIN MICROBIOL. 2003, 41(9): 4431-4434.
- [91] Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, et al. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in Ornithodoros erraticus[J]. ARCH VIROL. 2006, 151(4): 819-826.
- [92] Erickson A, Fisher M, Furukawa-Stoffer T, et al. A multiplex reverse transcription PCR and automated electronic microarray assay for detection and differentiation of seven viruses affecting swine[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2018, 65(2): e272-e283.
- [93] Xiao L, Wang Y, Kang R, et al. Development and application of a novel Bio-Plex suspension array system for high-throughput multiplexed nucleic acid detection of seven respiratory and reproductive pathogens in swine[J]. J VIROL METHODS. 2018, 261: 104-111.
- [94] Belák S, Thorén P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade[J]. EXPERT REV MOL DIAGN. 2001, 1(4): 434-443.
- [95] King DP, Reid SM, Hutchings GH, et al. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus[J]. J VIROL METHODS. 2003, 107(1): 53-61.
- [96] Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, et al. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus[J]. J VIROL METHODS. 2011, 178(1-2): 161-170.
- [97] Fernandez-Pinero J, Gallardo C, Elizalde M, et al. Molecular diagnosis of African swine fever by a new

real-time PCR using Universal Probe Library.[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2013, 60(1): 48-58.

- [98] Biagetti M, Cuccioloni M, Bonfili L, et al. Chimeric DNA/LNA-based biosensor for the rapid detection of African swine fever virus[J]. TALANTA. 2018, 184: 35-41.
- [99] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008, 27(3): 224-243.
- [100] Fan X, Li L, Zhao Y, et al. Clinical Validation of Two Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus[J]. FRONT MICROBIOL. 2020, 11: 1696.
- [101] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLOS BIOL. 2006, 4(7): e204.
- [102] Euler M, Wang Y, Nentwich O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus[J]. J CLIN VIROL. 2012, 54(4): 308-312.
- [103] Wang J, Wang J, Geng Y, et al. A recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of African swine fever virus[J]. CAN J VET RES. 2017, 81(4): 308-312.
- [104] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. NUCLEIC ACIDS RES. 2000, 28(12): e63.
- [105] James HE, Ebert K, McGonigle R, et al. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification[J]. J VIROL METHODS. 2010, 164(1-2): 68-74.
- [106] Tran DH, Tran HT, Le UP, et al. Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: A validation study during an outbreak in Vietnam[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2021, 68(4): 2595-2602.
- [107] Zhu YS, Shao N, Chen JW, et al. Multiplex and visual detection of African Swine Fever Virus (ASFV) based on Hive-Chip and direct loop-mediated isothermal amplification[J]. ANAL CHIM ACTA. 2020, 1140: 30-40.
- [108] Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes[J]. J CLIN MICROBIOL. 2003, 41(12): 5517-5524.
- [109] Xu G, Hu L, Zhong H, et al. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification[J]. Sci Rep. 2012, 2: 246.
- [110] Zheng F, Li S, Wang S, et al. Cross-priming isothermal amplification combined with nucleic acid test strips for detection of meat species[J]. ANAL BIOCHEM. 2020, 597: 113672.
- [111] Frączyk M, Woźniakowski G, Kowalczyk A, et al. Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus, in pig and wild boar blood and sera samples[J]. LETT APPL MICROBIOL. 2016, 62(5): 386-391.
- [112] Pan IC, De Boer CJ, Hess WR. African swine fever: application of immunoelectroosmophoresis for the detection of antibody[J]. Can J Comp Med. 1972, 36(3): 309-316.
- [113] Wardley RC, Abu EE, Crowther JR, et al. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever virus antigen and antibody[J]. J Hyg (Lond). 1979, 83(2): 363-369.
- [114] Tabares E, Fernandez M, Salvador-Temprano E, et al. A reliable enzyme linked immunosorbent assay for African swine fever using the major structural protein as antigenic reagent[J]. ARCH VIROL. 1981, 70(3): 297-300.
- [115] Kollnberger SD, Gutierrez-Castañeda B, Foster-Cuevas M, et al. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody[J]. J GEN VIROL. 2002, 83(Pt 6): 1331-1342.
- [116] Oviedo JM, Rodríguez F, Gómez-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]. J

VIROL METHODS. 1997, 64(1): 27-35.

- [117] Pérez-Filgueira DM, González-Camacho F, Gallardo C, et al. 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]. J CLIN MICROBIOL. 2006, 44(9): 3114-3121.
- [118] Gallardo C, Blanco E, Rodríguez JM, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells[J]. J CLIN MICROBIOL. 2006, 44(3): 950-956.
- [119] Gallardo C, Reis AL, Kalema-Zikusoka G, et al. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever[J]. CLIN VACCINE IMMUNOL. 2009, 16(7): 1012-1020.
- [120] Pastor MJ, Laviada MD, Sanchez-Vizcaino JM, et al. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay[J]. CAN J VET RES. 1989, 53(1): 105-107.
- [121] Gallardo C, Nieto R, Soler A, et al. 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]. J CLIN MICROBIOL. 2015, 53(8): 2555-2565.
- [122] Kazakova AS, Imatdinov IR, Dubrovskaya OA, et al. Recombinant Protein p30 for Serological Diagnosis of African Swine Fever by Immunoblotting Assay[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2017, 64(5): 1479-1492.
- [123] 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.
- [124] Cadenas-Fernández E, Sánchez-Vizcaíno JM, van den Born E, et al. High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge[J]. Vaccines (Basel). 2021, 9(3).
- [125] Arias M, de la Torre A, Dixon L, et al. Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines[J]. Vaccines (Basel). 2017, 5(4).
- [126] 黄剑, 李国新, 童光志. 非洲猪瘟的流行病学及疫苗研究新进展[J]. 中国动物传染病学报. 2022.
- [127] 王西西, 陈青, 吴映彤, 等. 非洲猪瘟疫苗研究进展[J]. 中国动物传染病学报. 2018.
- [128] Balysheva VI, Prudnikova EY, Galnbek TV, et al. Immunological Properties of Attenuated Variants of African Swine Fever Virus Isolated in the Russian Federation[J]. Russian Agricultural Sciences. 2015, 41(2/3): 178-182.
- [129] Lopez E, van Heerden J, Bosch-Camós L, et al. Live Attenuated African Swine Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Cross-Protection[J]. Viruses. 2020, 12(12).
- [130] A. L, R. C, B. C, 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]. The Journal of General Virology: A Federation of European Miorobiological Societies Journal. 2001, 82(3): 513-523.
- [131] Sánchez-Cordón PJ, Chapman D, Jabbar T, et al. Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3[J]. Antiviral Res. 2017, 138: 1-8.
- [132] Barasona JA, Gallardo C, Cadenas-Fernández E, et al. First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II[J]. Front Vet Sci. 2019, 6: 137.
- [133] Ramirez-Medina E, Vuono E, Rai A, et al. Deletion of E184L, a Putative DIVA Target from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus, Produces a Reduction in Virulence and Protection against Virulent Challenge[J]. J VIROL. 2022, 96(1): e141921.
- [134] Wang T, Luo R, Sun Y, et al. Current efforts towards safe and effective live attenuated vaccines against African swine fever: challenges and prospects[J]. INFECT DIS POVERTY. 2021, 10(1): 137.
- [135] O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, et al. African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), when Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation

in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge[J]. J VIROL. 2015, 89(16): 8556-8566.

- [136] Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, et al. ASFV-G-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever[J]. Viruses. 2021, 13(5).
- [137] Zhang Y, Ke J, Zhang J, et al. African Swine Fever Virus Bearing an I226R Gene Deletion Elicits Robust Immunity in Pigs to African Swine Fever[J]. J VIROL. 2021, 95(23): e119921.
- [138] Gladue DP, Ramirez-Medina E, Vuono E, et al. Deletion of the A137R Gene from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus Attenuates the Strain and Offers Protection against the Virulent Pandemic Virus[J]. J VIROL. 2021, 95(21): e113921.
- [139] Monteagudo PL, Lacasta A, López E, et al. BA71 △ CD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities[J]. J VIROL. 2017, 91(21).
- [140] Gladue DP, O'Donnell V, Ramirez-Medina E, et al. Deletion of CD2-Like (CD2v) and C-Type Lectin-Like

(EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia- Δ 9GL Abrogates Its Effectiveness as an

Experimental Vaccine[J]. Viruses. 2020, 12(10).

- [141] Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, et al. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus[J]. VIRUS RES. 2016, 213: 165-171.
- [142] Moore DM, Zsak L, Neilan JG, et al. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine[J]. J VIROL. 1998, 72(12): 10310-10315.
- [143] Neilan JG, Zsak L, Lu Z, et al. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome[J]. J VIROL. 2002, 76(7): 3095-3104.
- [144] O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge[J]. VIRUS RES. 2016, 221: 8-14.
- [145] Chen W, Zhao D, He X, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs[J]. SCI CHINA LIFE SCI. 2020, 63(5): 623-634.
- [146] Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, et al. Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain[J]. J VIROL. 2020, 94(7).
- [147] Tran XH, Le TTP, Nguyen QH, et al. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G- △ I177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain[J]. TRANSBOUND EMERG DIS. 2022, 69(4): e497-e504.
- [148] Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, 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.
- [149] Barderas MG, Rodríguez F, Gómez-Puertas P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins[J]. ARCH VIROL. 2001, 146(9): 1681-1691.
- [150] Neilan JG, 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.
- [151] Ruiz-Gonzalvo F, Rodríguez F, Escribano JM. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus[J]. VIROLOGY. 1996, 218(1): 285-289.
- [152] Argilaguet JM, 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.

- [153] Argilaguet JM, Pérez-Martín E, Nofrarías M, et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies[J]. PLOS ONE. 2012, 7(9): e40942.
- [154] Oura C, Denyer MS, Takamatsu H, et al. In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus[J]. J GEN VIROL. 2005, 86(Pt 9): 2445-2450.
- [155] Netherton CL, Goatley LC, Reis AL, et al. Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens[J]. FRONT IMMUNOL. 2019, 10: 1318.
- [156] Lokhandwala S, Petrovan V, Popescu L, et al. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate[J]. VET MICROBIOL. 2019, 235: 10-20.
- [157] Murgia MV, Mogler M, Certoma A, et al. Evaluation of an African swine fever (ASF) vaccine strategy incorporating priming with an alphavirus-expressed antigen followed by boosting with attenuated ASF virus[J]. ARCH VIROL. 2019, 164(2): 359-370.
- [158] Jancovich JK, Chapman D, Hansen DT, et al. Immunization of Pigs by DNA Prime and Recombinant Vaccinia Virus Boost To Identify and Rank African Swine Fever Virus Immunogenic and Protective Proteins[J]. J VIROL. 2018, 92(8).
- [159] Goatley LC, Reis AL, Portugal R, et al. A Pool of Eight Virally Vectored African Swine Fever Antigens Protect Pigs Against Fatal Disease[J]. Vaccines (Basel). 2020, 8(2).
- [160] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. CELL. 2010, 140(6): 805-820.
- [161] van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons[J]. IMMUNITY. 2006, 25(3): 361-372.
- [162] Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway[J]. SCIENCE. 2013, 339(6121): 786-791.
- [163] Razzuoli E, Franzoni G, Carta T, et al. Modulation of Type I Interferon System by African Swine Fever Virus[J]. Pathogens. 2020, 9(5).
- [164] Seo GJ, Kim C, Shin WJ, et al. TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing[J]. NAT COMMUN. 2018, 9(1): 613.
- [165] Goubau D, Deddouche S, Reis ESC. Cytosolic sensing of viruses[J]. IMMUNITY. 2013, 38(5): 855-869.
- [166] Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106(49): 20842-20846.
- [167] Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity[J]. NATURE. 2009, 461(7265): 788-792.
- [168] Hong J, Chi X, Yuan X, et al. I226R Protein of African Swine Fever Virus Is a Suppressor of Innate Antiviral Responses[J]. Viruses. 2022, 14(3).
- [169] 李航, 戚睿斌, 陈宗艳, 等. 外源蛋白表达系统及其应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医. 2021(07): 34-37.
- [170] Sun E, Zhang Z, Wang Z, et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020[J]. SCI CHINA LIFE SCI. 2021, 64(5): 752-765.