

# 基于非洲猪瘟病毒 MGF505-3R 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立

全吉玛<sup>1</sup>, 杨福荣<sup>2</sup>, 李栋凡<sup>2</sup>, 田永祥<sup>3</sup>, 杨克礼<sup>3</sup>, 李畅<sup>3</sup>, 刘威<sup>3</sup>, 郭锐<sup>3</sup>, 袁芳艳<sup>3</sup>,  
高婷<sup>3</sup>, 刘泽文<sup>3</sup>, 姚敏<sup>1\*</sup>, 周丹娜<sup>3\*</sup>

(1. 长江大学 动物科学技术学院, 湖北 荆州 434000; 2. 华中农业大学 动物医学院, 武汉 430070;  
3. 湖北农业科学研究院 畜牧兽医研究所, 武汉 430064)



中图分类号: S852.65<sup>+</sup>9.1

文献标识码: A

**摘要:**为了建立检测非洲猪瘟病毒(ASFV)的间接 ELISA 检测方法,试验基于 ASFV MGF505-3R 基因序列,构建 pET-28a(+)-3R 原核表达系统和 pFastBac1-3R 杆状病毒表达系统,分别通过 37 °C 诱导 5 h 和 28 °C 培养 5 d 获得 3R 重组蛋白,以此为包被抗原建立快速检测 ASFV 的间接 ELISA 检测方法,对该检测方法的反应条件、阴阳性临界值、敏感性、特异性及重复性进行检测,并用该检测方法与 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒对 70 份临床血清样品进行符合率验证试验。结果表明:原核表达系统与杆状病毒表达系统表达的 3R 重组蛋白抗原特异性均良好。利用杆状病毒表达系统表达的 3R 重组蛋白为包被抗原建立的间接 ELISA 检测方法的最佳条件为:包被浓度为 2 μg/mL,血清稀释度为 1:80,5% BSA 37 °C 封闭 2 h,ASFV 阳性血清(一抗)37 °C 孵育 90 min,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪 IgG(二抗)37 °C 孵育 45 min。该间接 ELISA 检测方法的批间和批内变异系数均小于 10%;与猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)等常见病原阳性血清无交叉反应;该检测方法的临界值为 0.38,ASFV 阳性血清稀释至 640 倍检测仍高于临界值。该检测方法 with ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒的阳性符合率、阴性符合率、整体符合率分别为 92%(37/40)、86%(26/30)、90%(63/70)。说明试验基于 3R 重组蛋白建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的特异性、敏感性与重复性,可以用于临床血清样品中 ASFV 抗体的检测。

**关键词:**非洲猪瘟病毒(ASFV);原核表达系统;杆状病毒表达系统;3R 蛋白;间接 ELISA

## Establishment of an indirect ELISA detection method based on African swine fever virus MGF505-3R protein

QUAN Jima<sup>1</sup>, YANG Furong<sup>2</sup>, LI Dongfan<sup>2</sup>, TIAN Yongxiang<sup>3</sup>, YANG Keli<sup>3</sup>, LI Chang<sup>3</sup>, LIU Wei<sup>3</sup>,  
GUO Rui<sup>3</sup>, YUAN Fangyan<sup>3</sup>, GAO Ting<sup>3</sup>, LIU Zewen<sup>3</sup>, YAO Min<sup>1\*</sup>, ZHOU Danna<sup>3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** In order to establish an indirect ELISA method for the detection of African swine fever virus (ASFV), in the experiment, based on the ASFV MGF505-3R gene sequence, the pET-28a(+)-3R prokaryotic expression system and pFastBac1-3R baculovirus expression system were constructed, and the 3R recombinant protein was obtained by induction at 37 °C for 5 h and 28 °C for 5 days, respectively, which were the coated antigen; an indirect ELISA method for the rapid detection of ASFV was established; and the reaction conditions, positive and negative cut-offs, sensitivity, specificity and repeatability of the detection method were detected, and the coincidence rate verification test of 70 clinical serum samples was carried out with the detection method and the ASFV antibody ELISA detection kit. The results showed that the specificity of the 3R recombinant protein antigen expressed by the prokaryotic expression system and the baculovirus expression system was good. The optimal conditions for the indirect ELISA detection method using the 3R recombinant protein expressed in the baculovirus system were as follows: coating concentration of 2 μg/mL, serum dilution of 1:80, blocking of 5% BSA at 37 °C for 2 h, incubation of ASFV-positive serum (primary antibody) at 37 °C for 90 min, and incubation of horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-porcine IgG (secondary antibody) at 37 °C for 45 min. The indirect ELISA detection method had a coefficient of variation of less than 10% between batches and within assays, and had no cross-reactivity with the positive sera of common pathogens such as Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), Porcine circovirus type 2

收稿日期:2023-06-14; 修回日期:2023-12-11

基金项目:湖北省科技重大专项(2022ABA002);湖北省农业技术产业体系项目([2020]-09533);湖北省农业科技创新中心资助项目(2021-620-000-001-017)

作者简介:全吉玛(1997—),女(蒙古族),硕士研究生,研究方向为动物病毒分子生物学,1656287744@qq.com.

通信作者:姚敏(1980—),女,副教授,博士,硕士生导师,研究方向为动物病原微生物感染机制,minyao@yangtzeu.edu.cn;周丹娜(1981—),女,研究员,博士,研究方向为动物传染病的新型疫苗和快速诊断试剂,zdn66@hbaas.com.



(PCV-2) and Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and the cut-off value of the detection method was 0.38, and the detection of ASFV positive serum diluted to 640 times was still higher than the cut-off value. The positive coincidence rate, negative coincidence rate, and overall coincidence rate of the detection method with the ASFV antibody ELISA detection kit were 92% (37/40), 86% (26/30), and 90% (63/70), respectively. The results indicated that the indirect ELISA method based on the 3R recombinant protein had good specificity, sensitivity and reproducibility, and could be used for the detection of ASFV antibody in clinical serum samples.

**Keywords:** African swine fever virus (ASFV); prokaryotic expression system; baculovirus expression system; 3R protein; indirect ELISA

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是一种由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的急性、热性、出血性和高度接触性传染病, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为法定通报动物疫病, 也是我国的一类动物疫病<sup>[1]</sup>。2018年8月份, ASFV 在我国境内连续暴发, 使国内生猪产业受到重创, 造成重大的经济损失<sup>[2-7]</sup>。感染 ASFV 可引起猪心脏组织缺血, 心肌纤维肿胀, 血管坏死、脱落; 胃肠道浆膜明显出血和水肿, 肠道损伤<sup>[8-9]</sup>。此外, ASFV 对外界环境有极强的抵抗力, 在各种猪源产品、虫媒和受污染的环境中可保持较长时间的感染性<sup>[10]</sup>。目前尚无有效疫苗和特效药用于防控 ASF, 因此建立快速诊断方法和免疫预防体系尤为重要。近年来, ASFV 多基因家族 (MGFs) 基因缺失疫苗被认为是研制 ASF 疫苗的主要方向<sup>[11]</sup>。同时在我国一些猪场鉴定出使用 MGF 和 CD2v 基因缺失毒株生产的非法疫苗株, 这些疫苗株毒力减弱, 接种该疫苗株的病猪出现死亡率降低、潜伏期延长的情况; ASFV 弱毒株感染猪群后, 其隐蔽性更强、潜伏期更长且排毒不规律, 猪场在进行防控时更容易出现漏检, 因此迫切需要建立更灵敏快速的抗体检测方法<sup>[12-13]</sup>。

ASFV 是一种有内外囊膜的二十面体双链 DNA 病毒, 病毒粒子直径约为 200 nm。ASFV 基因组长度约为 200 kb, 包含至少 5 个 MGFs, 其中 MGF100、MGF110、MGF300、MGF360、MGF505/530 占 ASFV 基因组开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 的 30%<sup>[2]</sup>。MGF505 基因家族包括 MGF505-1R、MGF505-2R、MGF505-3R, 其位于 ASFV 的左右末端可变区, 是 ASFV 基因缺失重组致弱苗基因结构右侧方位的第三段基因。研究结果表明, MGF505 基因家族对 ASFV 细胞嗜性、毒力、在巨噬细胞中的复制能力起决定性作用<sup>[5, 14-16]</sup>, 且能显著抑制 I 型干扰素表达, 调控促炎性细胞因子表达, 提高感染细胞内病毒增殖速度, 但其单个基因的作用机制尚不清楚<sup>[17]</sup>。敲除 ASFV 强毒株或弱毒株 MGF505 家族的某些基因可显著降低病毒在巨噬细胞内的繁殖速度<sup>[18]</sup>。MGF505-3R 蛋白为跨膜蛋白, 其二级结构由无规则卷曲、 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠组成, 三级结构预测结果与二级结构相符。本研究以 ASFV 3R 蛋白为研究对象, 构建 ASFV MGF505-3R 蛋白的原核表达系统和杆状病毒表达系统, 表达并纯化 3R 重组蛋白, 再基于 3R 重组蛋白建立间接 ELISA 检测方法, 以期 ASFV 检测方法的建立提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要细胞及样品

Sf9 细胞、pET-28a(+) 载体、pFastBac1 载体, 均由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所保存并提供; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞、大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; SFV 基因组、ASFV 毒株、10 份 ASFV 阳性血清、10 份猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 阳性血清、10 份猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) 阳性血清、10 份猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 阳性血清、54 份 ASFV 阴性血清、5 份 ASFV 弱毒阳性血清、5 份 ASFV 野毒阳性血清、70 份临床血清样品, 均由华中农业大学动物生物安全三级实验室保存并提供。

### 1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗猪 IgG, 均购自武汉三鹰科技有限公司; 限制性内切酶 EcoR I、Xho I 及 Hind III, 均购自 Biolabs 公司; DMEM 细胞基础培养基, 购自 Gibco 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG、花青素荧光染料 (CY3) 标记的羊抗猪 IgG, 均购自 Biodragon 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、LipoInsect<sup>TM</sup> 转染试剂、杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒, 均购自碧云天生物试剂有限公司; SF-SFM 培养基, 购自 Celligent 公司; ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒, 购自北京标驰惠泽生物科技有限公司; LB 肉汤、LB 营养琼脂, 均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.3 主要仪器

超净工作台, 购自苏州安泰空气技术有限公司; L1 低温连接仪, 购自珠海黑马医学仪器有限公司; PCR 扩增仪、酶标仪, 均购自 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, 购自上海勤祥科学仪器有限公司; 电泳仪, 购自北京六一生物科技有限公司; 电子分析天平, 购自梅特勒-托利多仪器有限公司; 恒温振荡器型温箱, 购自武汉博尔德科技发展有限公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 28 °C 细胞培养箱, 购自 REVCO 公司。

## 2 方法

### 2.1 ASFV 3R 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

根据 GenBank 中已发表的 ASFV MGF505-3R 基



因序列,通过 PCR 扩增构建 pET-28a(+)-3R 原核表达系统和 pFastBac1-3R 杆状病毒表达系统。两种表达系统的 PCR 扩增体系:上下游引物各 2 μL,2× Rapid Taq Master Mix 25 μL,DNA 模板 4 μL,用超纯水补足至 50 μL。PCR 扩增程序:93 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 5 min,共 35 个循环;72 °C 再延伸 7 min。构建 pET-28a(+)-3R 原核表达系统使用的引物为 MGF-505-3R-F 5'-CGGAATTCATGTCCTCTTCTCTTCAGGAAGTT-3'(下画线部分为 EcoR I 的酶切位点)和 MGF-505-3R-R 5'-CCCTCGAGCTAGCTTTCCAGGTTTCGAAG-3'(下画线部分为 Xho I 的酶切位点);构建 pFastBac1-3R 杆状病毒表达系统使用的引物为 MGF-505-3R-F 5'-CGGAATTCATGTCCTCTTCTCTTCAGGAAGTTT-3'(下画线部分为 EcoR I 的酶切位点)和 MGF-505-3R-R 5'-CCAAGCTTCTAGCTTTCCAGGTTTCGAAG-3'(下画线部分为 Hind III 的酶切位点)。

将构建的 pET-28a(+)-3R 原核表达系统转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,37 °C、200 r/min 摇床过夜活化后分为未诱导组和诱导组;按照 1:100 比例转接于 LB 液体培养基中,培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~1 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37 °C、200 r/min 摇床诱导表达 8 h;12 000 r/min 离心 10 min;收集菌体沉淀,重悬菌体于冰浴条件下进行低温高压破碎至菌液澄清,1 200 r/min 离心 10 min 后取上清液和沉淀,通过 SDS-PAGE 分析 3R 重组蛋白的表达情况,对 3R 重组蛋白进行大量纯化及浓度测定。

将构建的 pFastBac1-3R 杆状病毒表达系统转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选、四区划线纯化;挑取白色单个菌落,使用通用引物(pUC/M13-F 5'-CCCAGTCACGACGTTGTTAAAACG-3', pUC/M13-R 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3')进行 PCR 鉴定(PCR 扩增体系和程序同上)筛选出阳性菌株;将其转接 LB 液体培养基中过夜培养;收集菌液,按照杆状病毒穿梭载体 bacmid 少量抽提试剂盒说明书提取重组杆粒。用 6 孔细胞培养板培养 Sf9 细胞,80 万个/孔,待细胞密度达到 70%~90%时按照 LipoInsect™ 转染试剂说明书进行转染,将转染的细胞分为接毒组、空载组(pFastBac1 载体)和空白组,置 28 °C 细胞培养箱中培养 72 h,直至观察到细胞病变,收集每孔培养液,500 r/min 离心 5 min,获得的上清液即为 P1 代杆状病毒。将收取的 P1 代杆状病毒接入密度达到 1.5×10<sup>6</sup>~2.0×10<sup>6</sup> 个/mL 的 Sf9 细胞中培养,待出现细胞病变后收取 P2 代杆状病毒;取 P2 代杆状病毒 1 mL,接于 30 mL Sf9 细胞中培养,28 °C 培养至出现细胞病变后收取 P3 代杆状病毒;取 P3 代杆状病毒 12 mL,接于 400 mL Sf9 细胞

中培养,28 °C 培养至出现细胞病变后收取全部细胞及上清液进行超声破碎,对接毒组上清液、接毒组细胞上清液、空载组上清液、空载组细胞上清液、接毒组细胞沉淀、空载组细胞沉淀、空白组细胞沉淀进行 SDS-PAGE 分析,将电泳产物转印至 PVDF 膜,以 ASFV 阳性血清为一抗(稀释比例为 1:500)、HRP 标记的羊抗猪 IgG 为二抗(稀释比例为 1:5 000)进行 Western-blot 鉴定,分析蛋白质表达情况,并进行纯化及浓度测定。

对纯化后的原核表达 3R 重组蛋白和 pET-28a(+)-空载体进行 SDS-PAGE 分析,将电泳产物转印至 PVDF 膜上,以 ASFV 阳性血清为一抗(稀释比例为 1:500)、HRP 标记的羊抗猪 IgG 为二抗(稀释比例为 1:5 000)对原核表达 3R 重组蛋白、pET-28a(+)-空载体进行 Western-blot 鉴定。

通过间接免疫荧光法(IFA)验证细胞中表达的 3R 重组蛋白的结构活性,以 ASFV 阳性血清为一抗(稀释比例为 1:500)、CY3 标记的羊抗猪 IgG 为二抗(稀释比例为 1:100),以未感染杆状病毒的 Sf9 细胞为空白组。

## 2.2 ASFV 3R 重组蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.1 标准血清的制备 将经 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒检测为阴性的 10 份临床血清样品等体积混合均匀,作为标准阴性血清,分装后于-20 °C 保存,备用;将经 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒检测为阳性的 10 份临床血清样品等体积混合均匀,作为标准阳性血清,分装后于-20 °C 保存,备用。

2.2.2 方阵滴定法确定最佳包被浓度及血清稀释度 以纯化后的杆状病毒表达的 3R 重组蛋白作为包被抗原按照 4~0.25 μg/mL 进行纵向 2 倍倍比稀释,以 ASFV 标准阳性血清和标准阴性血清为一抗,按照 1:20~1:160 进行横向 2 倍倍比稀释,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(OD)值,以最大 P/N 值作为最佳包被浓度及血清稀释度。

2.2.3 封闭条件的确定 为了确定最佳封闭物和封闭时间,在其他条件不变的情况下,分别选择 2% 血清白蛋白(BSA)、5% BSA、2% 脱脂奶粉、5% 脱脂奶粉作为封闭物进行 ELISA 检测,根据 P/N 值确定最优封闭物;在 37 °C 条件下分别封闭 30 min、60 min、90 min、120 min,根据 P/N 值确定最佳封闭时间。

2.2.4 一抗最佳反应时间的确定 按照上述试验确定的条件对 ASFV 标准阳性血清和标准阴性血清进行检测,反应时间分别为 30 min、45 min、60 min、90 min,设置 3 个重复,根据 P/N 值确定最佳反应时间。

2.2.5 二抗最佳反应时间的确定 按照上述试验确定的条件对 ASFV 标准阳性血清和标准阴性血清进行检测,反应时间分别为 30 min、45 min、60 min、

90 min, 设置 3 个重复, 根据  $P/N$  值确定最佳反应时间。

2.2.6 阴阳性临界值的确定 根据上述试验结果, 对 54 份经 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒检测为阴性的血清进行 ELISA 检测, 计算  $S/P$  值的平均值( $\bar{x}$ ) 和标准差( $Sd$ ), 并确定阴阳性临界值。 $S/P = (\text{检测样品平均 } OD_{450} \text{ 值} - \text{标准阴性血清平均 } OD_{450} \text{ 值}) / (\text{标准阳性血清平均 } OD_{450} \text{ 值} - \text{标准阴性血清平均 } OD_{450} \text{ 值})$ 。 $S/P \text{ 值} \geq \bar{x} + 3Sd$  判定为阳性;  $S/P \text{ 值} \leq \bar{x} + 2Sd$  判定为阴性;  $\bar{x} + 2Sd < S/P \text{ 值} < \bar{x} + 3Sd$  判定为可疑, 需要再次重新检测, 若仍为可疑则判为阳性。

2.2.7 敏感性试验 对 ASFV 阳性血清按照 1:20 比例倍比稀释, 利用建立的间接 ELISA 检测方法进行检测, 确定 ASFV 阳性血清的最高检出效价。

2.2.8 特异性试验 使用已建立的间接 ELISA 检测方法对 PEDV、PCV-2、PRRSV 阳性血清及 ASFV 阴性、阳性血清进行检测, 验证该间接 ELISA 检测方法的特异性。

2.2.9 重复性试验 在相同条件下, 使用同一批次包被的酶标板, 利用建立的间接 ELISA 检测方法检测 1 份 ASFV 标准阳性血清、1 份 ASFV 标准阴性血清、3 份 ASFV 阳性血清、1 份 ASFV 阴性血清, 每个样品进行 3 次重复。

在相同条件下, 使用不同批次包被的酶标板对上述 6 份相同血清样品进行 3 次重复。

分别计算每次检测结果的  $\bar{x}$  和  $Sd$ , 计算其变异

系数( $CV = Sd/\bar{x} \times 100\%$ )。

2.2.10 间接 ELISA 检测方法的符合率及初步应用试验 使用本研究建立的间接 ELISA 检测方法检测 70 份临床血清样品, 并与 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒的检测结果进行对比, 计算两种方法符合率, 其中阳性符合率 = 间接 ELISA 方法检出的阳性血清符合数 / ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒检出的阳性血清数; 阴性符合率 = 间接 ELISA 方法检出的阴性血清符合数 / ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒检出的阴性血清数; 总符合率 = 间接 ELISA 方法检出的阴性、阳性血清总符合数 / 检测血清总数。使用本研究建立的间接 ELISA 检测方法和 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒对 5 份 ASFV 弱毒阳性血清 (编号为 1~5) 和 5 份 ASFV 野毒阳性血清 (编号为 I~V) 进行检测并对比。

### 3 结果与分析

#### 3.1 ASFV 3R 重组蛋白的表达及鉴定

SDS-PAGE 分析结果 (见图 1A) 显示, 3R 重组蛋白主要以包涵体形式表达, 大小约为 32.6 ku, 与预期大小相符。对包涵体进行变性、复性、透析, 经 BCA 蛋白定量试剂盒测定 3R 重组蛋白浓度为 12 mg/mL, 经 SDS-PAGE 分析在 32.6 ku 处出现纯度较好的目的条带 (见图 1B), 说明 3R 重组蛋白纯化效果好、纯度高。使用 ASFV 阳性血清对纯化后的 3R 重组蛋白进行 Western-blot 鉴定, 结果 (见图 1C) 在 32.6 ku 处出现目的条带, 说明其抗原性良好。

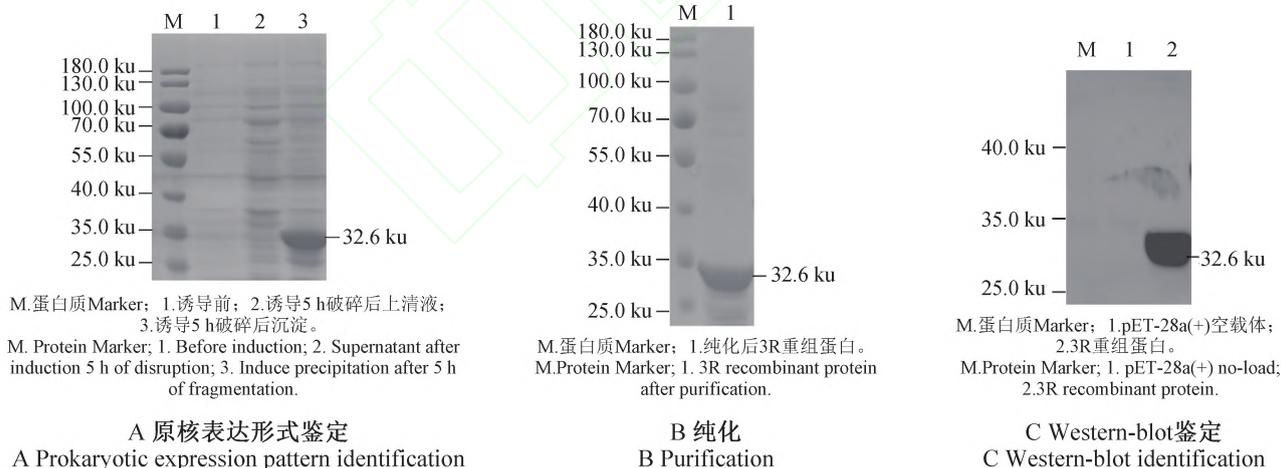
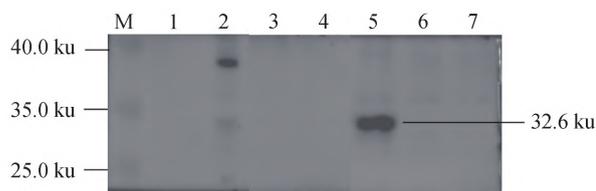


图 1 3R 重组蛋白的原核表达、纯化及鉴定结果

Fig. 1 Results of prokaryotic expression, purification and identification of 3R recombinant protein

将经 PCR 鉴定无误的重组杆粒按照 Lipoinsect™ 转染试剂说明书进行细胞转染, 转染 5 d 后成功获得携带 3R 重组蛋白的杆状病毒, 命名为 rB-3R, 收集 Sf9 细胞和培养基进行 Western-blot 鉴定, 结果 (见图 2A) 发现 3R 重组蛋白主要在细胞沉淀中表达。将 P3 代 rB-3R 接种于 400 mL Sf9 细胞中, 5 d 后收取细胞, 经超声破碎后按照包涵体纯化

方法进行纯化 (见图 2B)。经 BCA 蛋白定量试剂盒检测, 纯化后的 3R 重组蛋白浓度为 1.6 mg/mL。通过 IFA 检测细胞中 3R 重组蛋白的抗原特异性, 该试验设置接毒组与空白组, 其中空白组为未感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞, 结果 (见图 3) 接毒组 Sf9 细胞呈现明显的红色荧光, 而空白组无特异性荧光信号, 说明 rB-3R 在 Sf9 细胞中成功表达且与 ASFV 阳性血清反应良好。

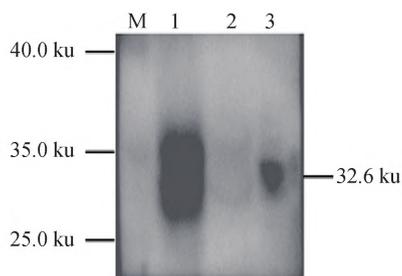


M.蛋白质Marker; 1.接毒组上清液; 2.接毒组细胞上清液;  
3.空载组上清液; 4.空载组细胞上清液; 5.接毒组细胞沉淀;  
6.空载组细胞沉淀; 7.空白组细胞沉淀。

M. Protein Marker; 1. Poisoning group supernatant; 2. Poisoning group cell supernatant; 3. Empty supernatant; 4. Empty cell supernatant; 5. Poisoning group precipitation; 6. Empty cell precipitation; 7. Negative control cell precipitation.

### A 杆状病毒表达形式鉴定结果

A Identification results of expression form of rod-shaped viruses



M.蛋白质Marker; 1.纯化前; 2.纯化过程中间产物; 3.纯化后。

M. Protein Marker; 1. Before purification; 2. Intermediates during purification; 3. After purification.

### B 纯化

B Purification

图2 3R重组蛋白的杆状病毒表达及纯化

Fig. 2 Baculovirus expression and purification of 3R recombinant protein

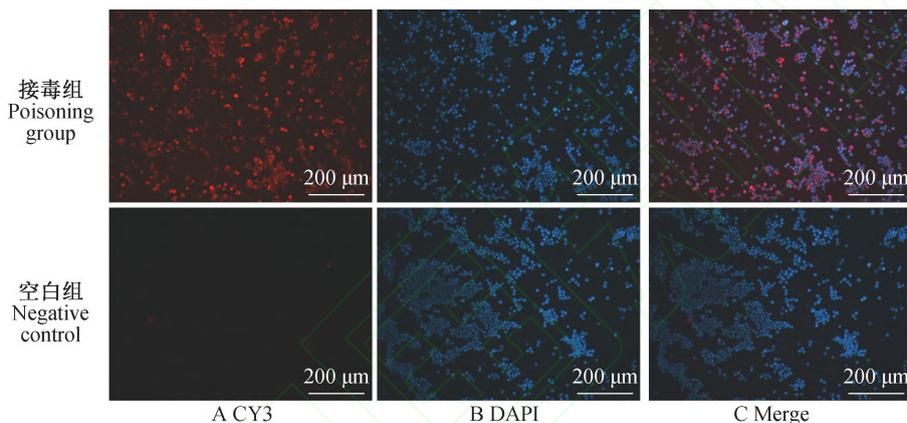


图3 3R重组蛋白的 IFA 鉴定结果

Fig. 3 IFA identification results of 3R recombinant protein

## 3.2 ASFV 3R 重组蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

### 3.2.1 3R 重组蛋白间接 ELISA 各反应条件的确定

按照间接 ELISA 检测方法的基本操作步骤,采用方阵滴定法优化各步骤的条件,最终得到间接 ELISA 检测方法的最佳条件:包被浓度为  $2 \mu\text{g/mL}$ ,血清稀释度为  $1:80$ ,5% BSA  $37^\circ\text{C}$  封闭  $120 \text{ min}$  (见图 4A、B),一抗  $37^\circ\text{C}$  孵育  $90 \text{ min}$  (见图 4C),二抗  $37^\circ\text{C}$  孵育  $45 \text{ min}$  (见图 4D)。

**3.2.2 阴阳性临界值的确定** 根据上述试验条件,对 54 份 ASFV 阴性血清进行 ELISA 检测,在所有血清样品  $\text{OD}_{450}$  值呈正态分布情况下,计算  $\bar{x}$  与  $Sd$  确定阴阳性临界值。通过计算,  $\bar{x} = 0.116$ ,  $Sd = 0.09$ ,由此确定阴阳性临界值为  $\bar{x} + 3Sd = 0.38$ ,  $\bar{x} + 2Sd = 0.29$ ;当  $S/P$  值  $> 0.38$  时,结果判定为阳性;当  $S/P$  值  $< 0.29$  时,结果判定为阴性;当  $0.29 \leq S/P$  值  $\leq 0.38$  时,结果判定为可疑,需重新检测。

**3.2.3 敏感性检测** 随机选取 ASFV 阳性血清进行倍比稀释,当阳性血清稀释至  $1:640$  时,其  $S/P$  值仍高于临界值  $0.38$ ,阳性血清稀释至  $1:1280$  时,其

$S/P$  值小于临界值  $0.38$  (见表 1),表明该检测方法敏感性较高。

**3.2.4 特异性试验** 使用建立的间接 ELISA 检测方法检测 PEDV、PCV-2、PRRSV 阳性血清及 ASFV 阴性、阳性血清,结果 (见图 5) PEDV、PCV-2、PRRSV 阳性血清检测结果为阴性,表明该检测方法特异性良好。

**3.2.5 重复性试验** 批内检测结果显示,各样品变异系数在  $1.83\% \sim 7.81\%$  之间,均小于  $10\%$  (见表 2),表明建立的间接 ELISA 检测方法批内重复性良好。

批间检测结果显示,各样品变异系数在  $0.45\% \sim 7.81\%$  之间,均小于  $10\%$  (见表 3),表明建立的间接 ELISA 检测方法批间重复性良好。

**3.2.6 间接 ELISA 检测方法的符合率及初步应用试验** 结果见表 4。间接 ELISA 检测方法 with ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒的整体符合率为  $90\%$  ( $63/70$ ),阳性符合率为  $92\%$  ( $37/40$ ),阴性符合率为  $86\%$  ( $26/30$ ),表明该检测方法灵敏度较高。

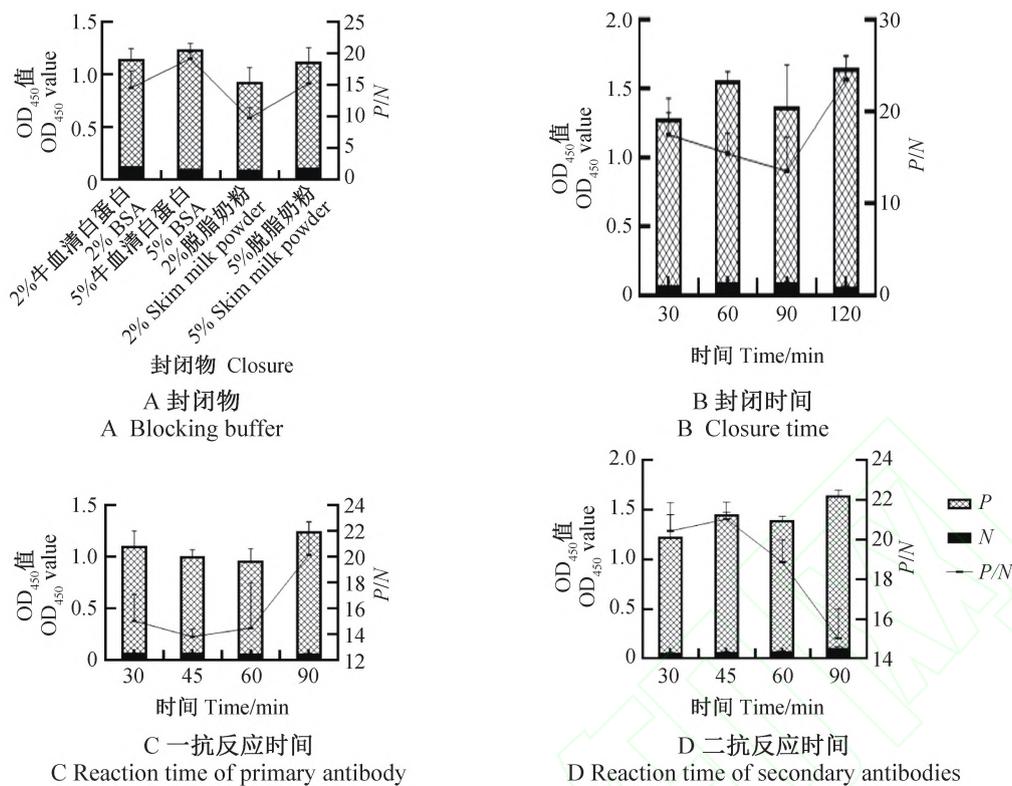


图4 间接ELISA最优反应条件的确定

Fig. 4 Indirect ELISA optimal reaction conditions

表1 敏感性检测结果

Table 1 Results of sensitivity test

项目 Item	血清稀释度 Serum dilution							
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280	1:2 560
S/P 值 S/P value	1.76	1.38	1.13	0.99	0.70	0.50	0.37	0.19
判定结果 Verdict result	+	+	+	+	+	-	-	-

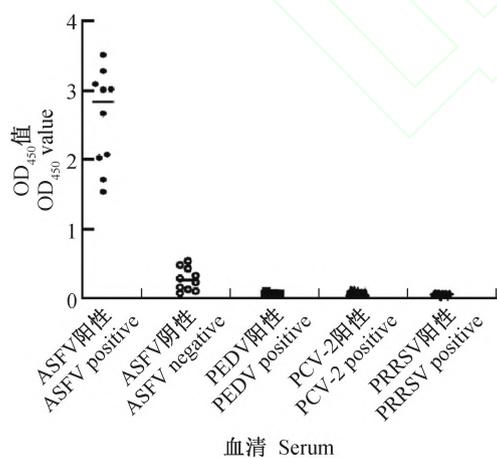


图5 特异性检测结果

Fig. 5 Results of specificity test

使用本研究建立的间接ELISA检测方法和ASFV抗体ELISA检测试剂盒对5份弱毒阳性血清(编号为1~5)和5份野毒阳性血清(编号为I~V)的检测结果进行对比,结果判定标准参考3.2.2及ASFV抗体ELISA检测试剂盒说明书(阳性S/P值≥

0.3;阴性S/P值<0.3),经对比发现间接ELISA检测方法可有效区分弱毒与野毒血清。见图6。

#### 4 讨论

目前ASFV MGFs的多种单基因功能仍未知,但有研究表明,MGF360和MGF505基因对于延长病毒的胞内存活时间、提高复制速度和抑制宿主生成I型干扰素起主导作用。基于MGFs的基因缺失疫苗是目前研制ASF疫苗的主要方向,本研究成功构建MGF505-3R的原核及杆状病毒表达系统,对研制ASFV抗体检测试剂盒具有重要意义。本研究将pET-28a(+)-3R原核表达系统转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,诱导3R重组蛋白表达,结果获得大量以包涵体形式表达的3R重组蛋白,然后按照变性、复性流程将其转化为可溶性蛋白进行纯化,最终得到了浓度为12 mg/mL的3R重组蛋白。本研究还将pFastBac1-3R杆状病毒表达系统转化至大肠杆菌DH10Bac感受态细胞中,再经PCR鉴定无误的重组杆粒转染Sf9细胞,结果成功表达并纯化了

表2 批内检测结果  
Table 2 Intra batch test results

样品 Sample	S/P 值 S/P value			平均值 $\bar{x}$	标准差 Sd	变异系数 CV/%
	重复 1	重复 2	重复 3			
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3			
标准阳性血清 Standard positive serum	1.39	1.65	1.66	1.57	0.12	7.81
标准阴性血清 Standard negative serum	0.04	0.05	0.05	0.04	0.00	3.76
ASFV 阳性血清 1 ASFV positive serum 1	1.64	1.68	1.55	1.62	0.05	3.19
ASFV 阳性血清 2 ASFV positive serum 2	1.86	1.81	1.78	1.82	0.03	1.83
ASFV 阳性血清 3 ASFV positive serum 3	1.17	1.11	1.13	1.13	0.02	2.26
ASFV 阴性血清 4 ASFV negative serum 4	0.05	0.05	0.04	0.05	0.00	5.06

表3 批间检测结果  
Table 3 Inter batch test results

样品 Sample	S/P 值 S/P value			平均值 $\bar{x}$	标准差 Sd	变异系数/% CV/%
	批次 1	批次 2	批次 3			
	Batch 1	Batch 2	Batch 3			
标准阳性血清 Standard positive serum	1.01	0.97	1.10	1.03	0.05	5.23
标准阴性血清 Standard negative serum	0.05	0.05	0.05	0.05	0.004	7.81
ASFV 阳性血清 1 ASFV positive serum 1	1.69	1.68	1.70	1.69	0.007	0.45
ASFV 阳性血清 2 ASFV positive serum 2	1.91	2.07	1.92	1.97	0.07	3.81
ASFV 阳性血清 3 ASFV positive serum 3	1.75	1.77	1.55	1.69	0.10	5.93
ASFV 阴性血清 4 ASFV negative serum 4	0.05	0.05	0.04	0.05	0.003	7.28

表4 血清样品检测结果  
Table 4 Detect results of serum samples

样品 Sample	间接 ELISA 检测结果 Indirect ELISA test results/份		合计 Total/份	符合率 Ratio/%	
	阳性血清数	阴性血清数			
	Positive serum servings	Negative serum servings			
商品化试剂 盒检测结果 Commercial reagent box test results	阳性血清份数 Positive serum servings	37	3	40	92
	阴性血清份数 Negative serum servings	6	26	30	86
	合计 Total	49	21	70	90

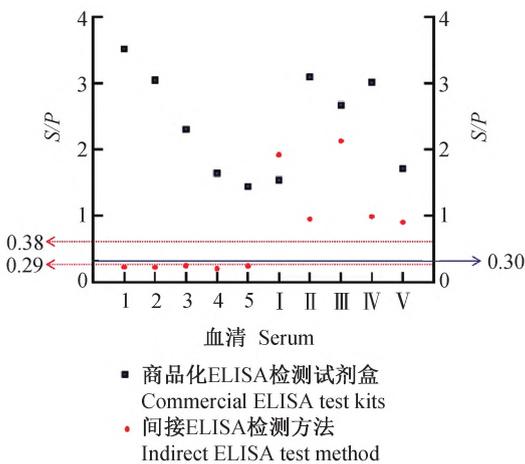


图6 血清样品检测结果

Fig. 6 Test results of serum samples

3R 重组蛋白,其浓度为 1.6 mg/mL。对比发现,原核表达系统具有构建步骤相对简单、蛋白质表达量高、表达周期短的优点,但在后续建立间接 ELISA 检测方法时,由于猪场猪群多存在大肠杆菌感染,导致建立的间接 ELISA 检测方法阴性背景值居高不下,假阳性结果偏多,试验无法顺利进行。应用杆状病毒表达系统表达蛋白,既含有真核细胞的高级修饰,又能高效大量表达,具有很高的研究价值,并且后续用于建立间接 ELISA 检测方法时也能有效解决因原核表达载体蛋白纯化不净导致的阴性背景值偏高问题,但真核表达的 3R 重组蛋白性质不是很稳定,对保存条件的要求十分严格,因此使用时应现用现制,避免反复冻融。

研究发现,敲除 MGF360/505 家族和 CD2v 基因



可产生单基因缺失、双基因缺失毒株,在我国一些猪场已鉴定出 MGF 和 CD2v 基因缺失的非法疫苗株,该疫苗株的毒力减弱,接种后患病猪的死亡率降低,潜伏期延长,且更容易向外界散播病毒<sup>[12-13]</sup>。MGF505-3R 作为 MGFs 中的一员,以其作为抗原建立间接 ELISA 检测方法能为后续 ASFV 不同毒株鉴别诊断方法的建立奠定基础。选择杆状病毒表达系统表达的 3R 重组蛋白作为包被蛋白,是因为其可有效避免原核表达载体蛋白纯化不净引起的阴性背景值居高不下,且临床血清样品多含有较高水平的大肠杆菌抗体,如使用原核表达的 3R 重组蛋白作为包被蛋白会导致间接 ELISA 方法检测到的假阳性结果较多。本研究所建立的间接 ELISA 检测方法 with ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒的总体符合率为 90%,阳性符合率为 92%,阴性符合率为 86%。从阳性检测结果来看,检测结果存在假阳性的可能,还需结合 IFA 进一步分析。

## 5 结论

本研究构建的 ASFV 3R 蛋白 pET-28a(+)-3R 原核表达系统在大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中能高效表达 3R 重组蛋白,该蛋白主要以包涵体形式存在;用构建的 ASFV 3R 蛋白 pFastBac1-3R 杆状病毒表达系统转染 Sf9 细胞,成功获得了在细胞沉淀中表达的 3R 重组蛋白。

本研究利用杆状病毒表达系统表达的 3R 重组蛋白建立间接 ELISA 检测方法,用该方法检测 70 份临床血清样品,并与 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒的检测结果进行对比,结果该间接 ELISA 检测方法的阳性符合率、阴性符合率分别为 92%(37/40)、86%(26/30),整体符合率为 90%(63/70),假阳性结果需再结合 IFA 检测结果进行分析。综上所述,本研究基于 3R 重组蛋白建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的特异性、敏感性与重复性,可以用于临床血清样品中 ASFV 抗体的检测。

## 参考文献:

[1] WANG N, ZHAO D M, WANG J L, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science, 2019, 366(6465): 640-644.  
[2] DUAN X H, RU Y, YANG W P, et al. Research progress on the proteins involved in African swine fever virus infection and replication[J]. Front Immunol, 2022, 13: 947180.

[3] GAUDREAU N N, RICHT J A. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus[J]. Vaccines, 2019, 7(2): 56.  
[4] ZHOU X T, LI N, LUO Y Z, et al. Emergence of African swine fever in China, 2018 [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65(6): 1482-1484.  
[5] NDLOVU S, WILLIAMSON A L, HEATH L, et al. Genome sequences of three African swine fever viruses of genotypes IV and XX from Zaire and South Africa, isolated from a domestic pig (*sus scrofa domestica*), a warthog (*Phacochoerus africanus*), and a European wild boar (*sus scrofa*) [J]. Microbiol Resour Announc, 2020, 9(32): e00341-e00320.  
[6] TRAN H T T, TRUONG A D, DANG A K, et al. Genetic characterization of African swine fever viruses circulating in North Central region of Vietnam [J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68(3): 1697-1699.  
[7] CHEN W Y, ZHAO D M, HE X J, 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.  
[8] 付静静, 刘伟琪, 李慧, 等. 非洲猪瘟病毒致心脏损伤的病理学观察及其损伤机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(13): 1-4, 130-131.  
[9] 许正涛, 李慧, 李樵锋, 等. 非洲猪瘟病毒感染致胃肠道损伤的病理学观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(05): 70-74, 79, 135-136.  
[10] 汪葆玥, 刘玉良, 马静, 等. 非洲猪瘟: 传染源和传播途径研究进展与分析[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(5): 103-110.  
[11] DING M Y, DANG W, LIU H N, et al. Combinational deletions of MGF360-9L and MGF505-7R attenuated highly virulent African swine fever virus and conferred protection against homologous challenge[J]. J Virol, 2022, 96(14): e0032922.  
[12] 王秀. 非洲猪瘟实验室检测技术研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2023, 44(4): 81-84.  
[13] 谢林梅, 唐子木, 钱新杰, 等. 非洲猪瘟病毒 p72 重组蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(13): 5-11.  
[14] 杨宏琳, 王幼明, 张毅, 等. 非洲猪瘟对我国生猪养殖的影响[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(5): 23-27.  
[15] 王孟月, 黄玉欣, 王彦伟, 等. 非洲猪瘟病毒 MGF360 蛋白原核表达质粒的构建及其蛋白表达与纯化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(23): 94-97.  
[16] 任名, 郭晓宇, 郭静, 等. 非洲猪瘟病毒 CRISPR/Cas9 敲除技术研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(4): 90-94.  
[17] HUANG Z, CAO H X, ZENG F L, et al. African swine fever virus MGF505-7R interacts with interferon regulatory factor 9 to evade the type I interferon signaling pathway and promote viral replication [J]. J Virol, 2023, 97(3): e0197722.  
[18] 武悦, 许会会, 徐一鸣, 等. 非洲猪瘟多基因家族 MGF-505-3R 基因重组原核表达质粒的构建及表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(6): 694-698.