

硕士专业
学位论文

非洲猪瘟病毒 p30 单克隆抗体的制备 及抗体化学发光法的建立

温升辉

廣西大學

二〇二四年八月

分类号 S855.3
密级 公开

学校代码 10593
学号 2118393075

硕士专业学位论文

非洲猪瘟病毒 p30 单克隆抗体的制备及抗体化学发光法的建立

The Preparation of Monoclonal Antibodies Against African Swine Fever Virus p30 and the Establishment of an Antibody Chemiluminescence Method

作者姓名: 温升辉

指导教师: 师铭咸 助理教授

合作导师: 刘 伟 助理研究员

专业名称: 兽医硕士

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 2024 年 7 月 26 日 学位授予日期 2024 年 8 月

答辩委员会主席 李 军 研究员

非洲猪瘟病毒 p30 单克隆抗体的制备及抗体化学发光法的建立

摘要

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种急性、热性、高度接触性和致死性动物疫病, 超急性型和急性型 ASFV 感染猪的死亡率近乎为 100%, 严重影响养猪业的发展及猪产品的国际贸易。ASFV 是一种大型线性双链 DNA 虫媒病毒, 为非洲猪瘟病毒科 (*Asfarviridae*) 的唯一成员, 其基因组长度在 170 至 194 kbp 之间, 编码 68 种结构蛋白和 150 多种非结构蛋白。到目前为止, ASF 已经给世界各国的生猪及相关产业造成了巨大的损失。利用快速、灵敏的检测技术准确诊断 ASFV 是控制 ASF 必不可少的技术手段。而由于我国出现中等毒力基因 II 型毒株以及基因 I 型弱毒株, 病猪出现持续性和慢性感染, 因此开发一种快速、灵敏的检测 ASFV 抗体的方法对有效防控 ASF 至关重要。

本研究通过优化 p30 基因序列, 利用大肠杆菌原核表达系统表达并纯化 p30 蛋白, 然后将其免疫小鼠, 最终获得 20 株单克隆抗体, 并利用 Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 对获得的单克隆抗体进行生物学特性分析。之后通过化学发光相加法和 WB 将 20 株 mAbs 分成了 11 组, 并通过 p30 截短重叠肽、丙氨酸突变以及 N 端和 C 端截短蛋白确定了单抗识别的最小抗原表位。此外, 从 200 多个 p30 序列选取 17 个具有代表性的 p30 序列使用 BioEDIT 软件进行序列比对, 验证 11 组单抗识别的表位在不同 ASFV 分离株间的保守性, 结果表明第 VI 组识别的表位中存在 1 个氨基酸变异 (Thr¹¹⁶ 变为 Ala¹¹⁶), 第 I-1 组、第 I-2 组、第 II-1 组、第 II-2 组、第 III 组和第 V 中单抗所识别的表位相对保守。由此推断, 这些抗原表位的单克隆抗体是建立特异性检测 ASFV 抗体方法的良好试剂。

本研究选取与 ASFV 抗原反应性好且与 ASFV 阳性血清具有良好竞争

能力的 mAb (16-5E7E8) 建立了一种快速检测 ASFV p30 抗体的竞争化学发光法 (p30-cCLIA)。首先利用棋盘滴定法优化反应条件和反应时间, 实验结果表明最佳抗原包被浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 血清稀释度为 1:10, 酶标单抗稀释度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 最佳反应时间为 30 min。通过检测已知背景的血清, 对建立的 p30-cCLIA 化学发光法在诊断特异性、诊断敏感性、灵敏度、重复性等方面进行了初步评价, 结果表明, 当 p30-cCLIA 的 Cut-off 值为 50% 时, 诊断敏感性为 100%, 诊断特异性为 100%, 并且具有较好的灵敏度、重复性。此外, p30-cCLIA 与猪的其它七种病毒阳性血清没有交叉反应。使用本研究建立的 p30-cCLIA 与商品化阻断 ELISA 试剂盒检测临床猪血清样品, 比较其诊断性能, 结果表明, p30-cCLIA 具有更高的灵敏度。

综上, 本研究成功获得 20 株抗 ASFV p30 的单克隆抗体, 通过 WB 和 IFA 对其生物学特性进行了分析, 并利用其中一株单抗 16-5E7E8 建立了一种检测 ASFV 抗体的竞争化学发光法, 这为之后大规模筛查 ASFV 感染猪, 并及时控制 ASF 传播和对流行病学调查提供了可靠的工具。

关键词: 非洲猪瘟 单克隆抗体 p30 表位鉴定 化学发光

THE PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AFRICAN SWINE FEVER VIRUS P30 AND THE ESTABLISHMENT OF AN ANTIBODY CHEMILUMINESCENCE METHOD

ABSTRACT

African swine fever (ASF), which is caused by the African swine fever virus (ASFV), is an acute, febrile, highly contagious and fatal animal epidemic disease. The mortality rate of pigs infected with superacute and acute ASF is almost 100%, seriously affecting the development of the pig industry and international trade of pork products. ASFV is a large linear double-stranded DNA arbovirus and the only member of the Asfarviridae family. Its genome length is between 170 and 194 kbp, encoding 68 structural proteins and more than 100 non-structural proteins. Up to now, ASF has caused huge losses to the pig industry and related industries in various countries around the world. Rapid and accurate diagnosis of ASF through sensitive detection technology is an indispensable technical means to promptly eradicate the source of infection, cut off the route of transmission, and effectively control ASF. However, due to the emergence of moderately virulent genotype II strains and weakly virulent genotype I strains in China, pigs suffer from persistent and chronic infections. Therefore, the detection of specific antibodies is particularly important for the detection and diagnosis of the epidemic. Therefore, the development of a rapid and sensitive method for detecting ASFV antibodies is crucial for the effective prevention and control of ASF.

This study optimized the p30 gene sequence, expressed and purified the p30 protein using the Escherichia coli prokaryotic expression system, and

then immunized mice with it, ultimately obtaining 20 monoclonal antibodies (mAbs). Subsequently, the biological characteristics of these mAbs were analyzed using Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). Furthermore, the 20 mAbs were grouped into 11 categories based on chemiluminescence addition and Western blot (WB). The minimal antigenic epitopes recognized by the mAbs were identified through truncated overlapping peptides of p30, alanine mutagenesis, and truncated proteins at both the N- and C-termini. Additionally, a representative set of 17 p30 sequences from over 200 sequences were selected and aligned using BioEDIT software to verify the conservation of epitopes recognized by the 11 groups of mAbs among different African swine fever virus (ASFV) isolates. The results indicated that one amino acid variation (Thr¹¹⁶ to Ala¹¹⁶) existed in the epitope recognized by Group VI, while the epitopes recognized by Groups I-1, I-2, II-1, II-2, III, and V were relatively conserved. Based on these findings, it is inferred that the monoclonal antibodies targeting these antigenic epitopes are promising reagents for developing specific detection methods for ASFV antibodies.

In this study, we selected a monoclonal antibody (16-5E7E8) with good reactivity to ASFV antigens and strong competitive ability with ASFV-positive serum to be labeled with HRP by a company. Using 16-5E7E8-HRP, we established a rapid competitive chemiluminescence immunoassay (p30-cCLIA) for detecting ASFV p30 antibodies. Firstly, the reaction conditions and reaction time were optimized using the checkerboard titration method. The experimental results showed that the optimal antigen coating concentration was 0.25 µg/mL, the serum dilution was 1:10, the enzyme-labeled monoclonal antibody dilution was 0.05 µg/mL, and the optimal reaction time was 30 minutes. By testing sera with known backgrounds, the diagnostic specificity, diagnostic sensitivity, and repeatability of the established p30-cCLIA were initially evaluated. The results

showed that when the Cut-off value of p30-cCLIA was 50%, the diagnostic sensitivity was 100%, the diagnostic specificity was 100%, and it had good sensitivity and repeatability. In addition, p30-cCLIA did not have cross-reactivity with positive sera of seven other pig viruses. By comparing the diagnostic performance of the p30-cCLIA established in this study with a commercial blocking ELISA kit for detecting clinical pig serum samples, the results showed that p30-cCLIA had higher sensitivity.

In summary, this study successfully recombinantly expressed 20 strains of mAbs against ASFV p30, analyzed their biological characteristics through Western Blotting and Immunofluorescence Assay, and established a competitive chemiluminescence method for detecting ASFV antibodies using one of the monoclonal antibodies, 16-5E7E8. This provides a reliable tool for subsequent large-scale screening of ASFV-infected pigs, timely control of ASF transmission, and epidemiological investigations.

KEY WORDS: African swine fever; mAbs; p30; Epitope Identification
Chemiluminescence

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 非洲猪瘟.....	1
1.1.1 非洲猪瘟及其危害.....	1
1.1.2 非洲猪瘟流行病学.....	1
1.1.3 非洲猪瘟病毒的结构.....	2
1.1.4 ASFV 主要结构蛋白 p30 及其功能.....	2
1.1.5 ASFV 的理化特性.....	3
1.1.6 ASFV 基因型与血清群.....	3
1.2 非洲猪瘟诊断现状.....	4
1.2.1 临床诊断.....	4
1.2.2 实验室诊断.....	4
1.3 单克隆抗体在诊断中的应用	9
1.4 化学发光免疫分析技术.....	10
1.4.1 化学发光原理.....	11
1.4.2 化学发光分类.....	11
1.5 研究目的和意义.....	13
第二章 p30 蛋白表达和 p30 单克隆抗体制备	14
2.1 材料.....	14
2.1.1 细胞、质粒及实验动物.....	14
2.1.2 主要试剂.....	14
2.1.3 常用试剂配制.....	14
2.1.4 实验仪器.....	15
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 目的基因合成及构建重组质粒.....	16
2.2.2 p30 重组蛋白的表达及纯化.....	16
2.2.3 p30 单克隆抗体的制备.....	18
2.3 结果.....	20
2.3.1 p30 重组蛋白的表达纯化与鉴定.....	20
2.3.2 单克隆抗体的纯化.....	20
2.3.3 20 株单克隆抗体的亚型鉴定.....	21
2.4 讨论.....	22
2.5 本章小结.....	23
第三章 20 株 ASFV p30 单克隆抗体识别表位的鉴定	24
3.1 材料.....	24

3.1.1 质粒、菌株和细胞.....	24
3.1.2 实验试剂.....	24
3.1.3 实验仪器.....	25
3.2 实验方法.....	25
3.2.1 IFA.....	25
3.2.2 Western blot.....	25
3.2.3 间接 CLIA 和间接 ELISA.....	25
3.2.4 化学发光相加法.....	26
3.2.5 p30 肽片段的表达.....	26
3.2.6 序列比对.....	27
3.3 实验结果.....	27
3.3.1 20 株单克隆抗体的反应性.....	27
3.3.2 化学发光相加法分类 mAbs.....	30
3.3.3 表位的表达与鉴定.....	33
3.3.4 不同 ASFV 分离株中表位的保守性.....	37
3.4 讨论.....	37
3.5 本章小结.....	38
第四章 检测 ASFV p30 抗体竞争化学发光法 p30-cCLIA 的建立 ...	39
4.1 材料.....	39
4.1.1 实验试剂.....	39
4.1.2 实验仪器.....	39
4.1.3 血清样本.....	39
4.2 实验方法.....	40
4.2.1 p30-cCLIA 的建立.....	40
4.2.2 抗体稳定剂加速实验.....	41
4.2.3 p30-cCLIA 检测血清样本.....	41
4.2.4 Cut-off 值、诊断敏感性(Dsn)、诊断特异性(Dsp)的确定 ...	42
4.2.5 p30-cCLIA 与商品化试剂盒检测性能对比.....	42
4.2.6 p30-cCLIA 灵敏度、重复性、交叉反应性实验.....	42
4.3 结果.....	43
4.3.1 p30-cCLIA 的最佳检测条件.....	43
4.3.2 酶标抗体稳定剂的筛选.....	44
4.3.3 p30-cCLIA 的 Cut off 值、Dsn、Dsp.....	45
4.3.4 p30-cCLIA 和商品化检测试剂盒检测性能对比.....	45
4.3.5 p30-cCLIA 灵敏度实验.....	46
4.3.6 p30-cCLIA 重复性实验.....	46
4.3.7 p30-cCLIA 特异性实验.....	47
4.4 讨论.....	48

4.5 本章小结.....	49
第五章 全文结论	50
参考文献.....	51

中文所用缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino acids	氨基酸
Amp ⁺	Ampicillin	氨苄抗性
Kan ⁺	Kanamycin	卡那抗性
ASF	African swine fever	非洲猪瘟
ASFV	African swine fever virus	非洲猪瘟病毒
FMDV	Foot-and-Mouth Disease Virus	口蹄疫病毒
CBS	Carbonate buffered saline	碳酸盐包被液
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟病毒
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	化学发光免疫分析
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
Dsn	Diagnostic sensitivity	诊断敏感性
Dsp	Diagnostic specificity	诊断特异性
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光实验
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactoside	异丙基- β -d-硫代半乳糖苷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis	十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺

续表

英文缩写	英文全称	中文名称
g	Gramme	克
h	Hour	小时
L	Liter	升
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
NSP	Non-structual protein	非结构蛋白
WOAH	World Organization for Animal Health	世界动物卫生组织
qPCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量聚合酶链式反应
RPA	Recombinase polymerase amplification	重组聚合酶扩增
rpm	Revolutions per minute	转/分
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
SP	Structural protein	结构蛋白
TCID ₅₀	Medium tissue culture infection dose	半数组织细胞感染量
μg	Microgramme	微克
μL	Microliter	微升
WB	Western blot	蛋白免疫印迹
kDa	kilodalton	千道尔顿

第一章 绪论

1.1 非洲猪瘟

1.1.1 非洲猪瘟及其危害

非洲猪瘟（African swine fever, ASF）是一种影响家猪和野猪的严重接触性的和出血性疫病，超急性型和急性型 ASFV 感染猪的死亡率近乎为 100%。世界动物卫生组织（World Organization for Animal Health, WOAH）将其列为必须通报的动物疫病，我国将其列为一类动物疫病^[1]。ASF 传播的主要途径包括受感染动物及其产品的运输^[2]；受感染的野猪是非常重要的感染源之一^[3]。非洲猪瘟病毒（African swine fever virus, ASFV）也可以在软蜱属（*Ornithodoros*）的软蜱中复制，包括非洲的 *O. moubata* 和伊比利亚半岛的 *O. erraticus*，它们参与了非洲猪瘟的流行病学循环^[4]。猪感染非洲猪瘟病毒的临床症状为发热（40~42℃）、心跳加快、呼吸窘迫、皮肤发绀、淋巴结、肾和胃肠道黏膜明显出血，自 2018 年以来，由于没有疫苗和药物可用，中国爆发的非洲猪瘟已导致数以万计的猪死亡或被屠宰^[5]。

1.1.2 非洲猪瘟流行病学

ASF 于 1909 年在肯尼亚被首次发现，Montgomery 将其描述为一种不同于猪瘟(CSFV)的疾病^[6]。20 世纪 60 年代至 80 年代，它从西班牙和葡萄牙传播到其他非洲国家和西欧国家^[6,7]，至 1990 年代中期，除撒丁岛外其他欧洲国家已经根除了 ASFV^[6,8]，ASF 多在撒哈拉以南的国家流行。2007 年，ASFV 重新进入高加索地区，并迅速蔓延到东欧国家^[6]，且自从进入东欧以来，该病严重影响了高加索地区和俄罗斯联邦生猪产业，目前 ASF 仍在俄罗斯中部和南部两个地区的家猪和野猪种群中大规模流行^[9]。欧洲野猪（*Sus scrofa*）极易感染 ASFV，并表现出与感染了 ASFV 家猪相似的临床症状和致死率；而感染了 ASFV 的非洲野猪（African Suidae）表现为长期持续性感染的亚临床症状和无症状，充当中间宿主^[10]。*Ornithodoros* 属的软蜱也是该病毒的生物载体和宿主^[11]。2018 年，类似 Georgia-07 的 II 型 ASFV 在中国出现^[12]，之后迅速传播到东南亚^[13]，ASF

在欧洲和亚洲一些国家的爆发使得损失了 700 多万头猪^[14]。

1.1.3 非洲猪瘟病毒的结构

ASFV 是一种大型线性双链 DNA (Double-stranded DNA, dsDNA) 虫媒病毒, 是非洲猪瘟病毒科 (Asfarviridae) 的唯一成员, 其基因组长度在 170 至 194 kbp 之间, 编码 68 种结构蛋白和 100 多种非结构蛋白^[15]。ASFV 是一种具有二十面体结构的 DNA 病毒, 病毒粒子直径在 260~300 nm 之间, 由内核、核壳、内膜、衣壳和囊膜五部分组成^[16-18]。囊膜是 ASFV 的最外层, 在病毒粒子的囊膜上可检测到部分 pEP402R (CD2v) 蛋白^[15]。在其表面的 p12 通过与宿主细胞膜上的特定受体结合来介导 ASFV 进入宿主细胞, 从而促进病毒颗粒的外膜蛋白吸附到宿主细胞上^[19]。衣壳是 ASFV 的第二层, 衣壳成分由 2760 个假六聚体和 12 个五聚体构成, 一个假六聚体由三个采用双胶卷结构的 p72 蛋白分子形成^[20]。pB438L 是形成衣壳所必需的蛋白质。除了 p72 和 pB438L 蛋白外, pE120R 也是组成病毒衣壳的蛋白之一^[1]。ASFV 第三层是内膜, 是从内质网分离出来的脂质双分子层膜^[21]。之前有研究认为 pE183R 是内膜形成的关键蛋白, 然而最近的一个研究指出内膜上还存在 p17、pE183L、p12、pE248R 和 pH108R 等蛋白, 其中 p12 和 pE248R 的作用是协助病毒侵入宿主机体。还有部分研究人员提出 p22 蛋白也是病毒内膜的一个组成成分^[15]。ASFV 的第四层核壳是其结构的重要组成部分, 具有直径为 180 纳米的尺寸。这个核壳的形成依赖于两种多蛋白前体 pp220 和 pp62, 它们在病毒蛋白酶 (pS273R) 的作用下被分解成多个成熟的蛋白质片段, 进而组装成核壳。ASFV 最里层是内核层, 含有基因组。ASFV 基因组约为 170~194 kbp 线性双链 DNA, 编码 150~170 个开放阅读框^[22]。病毒基因组的末端由共价交联的发夹环组成^[23]。p10 和 pA104R 是已在病毒类核中检测到的 DNA 结构蛋白。此外, ASFV 基因组编码许多与病毒复制、转录和免疫抑制相关的非结构蛋白^[1]。

1.1.4 ASFV 主要结构蛋白 p30 及其功能

p30 是 ASFV 感染宿主动物早期形成的膜蛋白之一, 由 CP204L 基因编码, 位于病毒包膜的膜上, 具有很高的保守性, 是最具有免疫原性的蛋白之一^[24,25]。

在病毒感染后约 2~4 h, 可以观察到 p30 的表达, 并且其表达一直持续到病毒生命周期结束^[26,27]。重组 p30 蛋白疫苗接种已被证明可以在猪中引起有效的抗体中和反应, 并提供不同程度的免疫保护^[25,28]。此外, 有研究表明, 病毒 p30 蛋白可以作为动物感染 ASFV 的指标之一^[29]。其在感染早期阶段的产生使其成为 ASFV 感染诊断检测的合适靶标^[30], 因此, p30 蛋白可用于 ASFV 的早期检测, 为控制 ASFV 的传播提供诊断工具。

1.1.5 ASFV 的理化特性

ASFV 在自然环境中具有很强的抵抗力, 但一些基于酚类和碘类化合物的脂质溶剂和商业消毒剂可有效将其杀灭。有研究表明, ASFV 对某些消毒剂非常敏感, 例如, 乙醚、氯仿、2%~3%次氯酸盐溶液以及 2%氢氧化钠等都能有效灭活 ASFV^[31]。ASFV 可在冷冻的肉类食品及咸干肉制品中存活数周甚至达数月之久^[32], 并且还具有一定的耐高温能力, 在 56℃ 的高温下, 需要长达 70 min 才能使其灭活, 温度提升到 60℃, 也仍然需要 20 min 才能使其失去活性^[33]。这表明, 在相对较高的环境温度下, ASFV 仍能保持相当的稳定性。此外, ASFV 具有一定的耐酸耐碱能力, 当环境中 $\text{pH} < 4$ 或 $\text{pH} > 11$ 才能使其灭活^[32]。

1.1.6 ASFV 基因型与血清群

根据 ASFV B646L 基因 3'端核苷酸序列, 将 ASFV 分为 24 种不同的基因型^[34]。所有 24 种基因型在非洲均有报道, 主要分布在东非和南非, 其中只有两种基因型传播到非洲以外。2018 年, 类似基因 II 型 (Georgia07) 的 ASFV 蔓延到中国和其他亚洲国家^[35,36]。ASFV 的毒力与基因类型并不完全相关, 这取决于特定的病毒株和动物物种^[37,38]。ASFV 强毒株传入我国后流行近三年内, 引发的急性疾病死亡率近 100%。随后, 2020 年出现了毒力较低的 II 型 ASFV, 它是由强毒株基因组的自然突变进化而来的^[39]。2021 年从猪场分离到 2 株毒力较低的 I 型毒力变异株^[38], 这些毒力较低的突变株可引起猪的慢性和持续性感染, 这给 ASF 的早期诊断和控制带来了困难。2023 年赵东明等在我国检测到三种基因型 I 和 II 型 ASFV 的重组体。这些重组体在基因上相似, 根据其 B646L 基因被归类为基因型 I, 但占其基因组 56% 以上的 10 个离散片段来自基因型 II 病毒^[36]。根

据抗体介导的红细胞吸附抑制实验，交叉保护的 ASFV 毒株可分为 8 个血清型^[34]，但很可能有更多血清型^[40,41]。对于疫苗的开发，ASF 的保护性免疫似乎取决于血清型，因为同一血清型内的病毒可为动物提供了相互交叉保护^[42-44]。与 p72 基因分型相比，基于 CD2v/C 型凝集素特征测序的血清分型方法可以更好地区分生物学相关表型^[43]。

1.2 非洲猪瘟诊断现状

1.2.1 临床诊断

感染 ASFV 的动物会产生多种综合征，根据临床症状程度不同可以分为超急性型、急性型、亚急性型和慢性型。超急性型 ASF 症状主要表现为无预兆的猝死^[45]，由于这一类型的 ASF 发病极为迅速，猪只可能在没有任何明显前驱症状的情况下突然死亡，因此很难在生前进行准确的诊断；急性型 ASF 其特征是潜伏期短（3~5 d），出现高热，5~10 d 内死亡；亚急性型 ASF 的临床特征是出现高热、出血和全身皮肤发红^[45]，以及脾脏充血肿大，淋巴结、肝脏和肾脏全身出血等症状，与脑脊液感染中出现的特征难以区分；慢性 ASFV 的症状轻，发病期长，且一些临床症状与其他的猪病如猪瘟（CSF）、猪皮炎和肾病综合症（PDNS）以及猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）症状相似，因此仅凭患病症状难以区分。

1.2.2 实验室诊断

1.2.2.1 病原学检测技术

1.2.2.1.1 红细胞吸附实验（Hemadsorption Test, HAD）

HAD 是检测非洲猪瘟活病毒的“金标准”^[46]。该方法的原理是 ASFV 在感染猪白细胞的培养物中复制时，会产生红细胞吸附反应，多数 ASFV 毒株会在感染的白细胞周围吸附猪红细胞，形成“玫瑰花环”或“桑葚状”的现象^[47]。该方法由 Malmquist 等^[48]建立，虽然检测灵敏性高，但检测周期长，无法实现快速检测。且之后的研究发现，没有发生红细胞吸附，也可以出现病变特征^[49]，导致易出现假阴性的结果，因此不适合广泛推广。

1.2.2.1.2 荧光抗体检测 (Fluorescent Antibody Test, FAT)

FAT 可用于检测可疑猪组织中的 ASFV 抗原^[50]。FAT 的原理是基于免疫学的抗原-抗体反应, 结合荧光标记技术来检测病毒抗原的存在。具体来说, FAT 在疑似感染 ASFV 的猪的印模涂片或器官材料的薄冷冻切片上应用。此外, FAT 不仅能用于直接检测猪组织样本中的 ASFV 抗原, 还能用于检测细胞中未观察到 HAD 的病毒抗原, 从而识别非红细胞吸附性毒株^[50]。这种方法的另一个重要特点是, 它还能区分由非洲猪瘟病毒产生的细胞病变效应 (CPE) 和其他病毒如 Aujeszky 病毒或细胞毒性接种物产生的 CPE, 从而提高了诊断的准确性。然而, FAT 在检测亚急性和慢性疾病中的 ASFV 时, 其敏感性会显著降低。

1.2.2.1.3 抗原 ELISA

ELISA 其基本原理是利用抗原抗体的特异性结合反应, 对待测样品的抗原进行定性或定量分析。Wardley 等^[51]发明了第一个用于检测 ASFV 抗原的直接 ELISA。随后, 1997 年 Vidal 等^[52]基于 VP73 单克隆抗体开发了一种夹心 ELISA 用于检测猪样本中 ASFV VP73 蛋白, 其检测限抗原浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法的优势在于检测成本低, 不需要昂贵的设备, 但是在诊断亚急性和慢性 ASF 时, ELISA 检测抗原的敏感性显著降低^[50]。

1.2.2.1.4 常规 PCR

PCR 技术与抗原检测其他方法 (例如抗原 ELISA 和 FAT 测定) 相比, 具有更高的灵敏度和特异性^[53]。PCR 技术可以在收到样本后数小时内做出 ASF 的诊断^[54]。目前已有许多用于 ASFV 检测的各种常规 PCR 测定^[55,56]。常规 PCR 大多已被 qPCR 检测所取代, 然而在缺少 qPCR 设备的实验室中其依旧是检测 ASFV 的常用方法^[50]。

1.2.2.1.5 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR)

qPCR 方法是基于靶标特异性“寡核苷酸探针”的荧光信号对靶序列的扩增进行实时检测, 与基于凝胶的传统 PCR 方法相比具有多项优势。qPCR 可以使用 96 孔规格, 因此非常适合高通量诊断系统, 并有可能实现过程自动化^[50]。qPCR

方法因其在速度、灵敏度、低交叉污染风险以及量化分析能力上的卓越表现，在病原学诊断领域受到了广泛的青睐和应用，成为了该领域最受欢迎的技术之一。这一技术的高效和精确性使其成为研究者和诊断专家们的首选工具。Tignon 等^[57]基于 VP72 基因建立了一种快速检测 ASFV 的实时 TaqMan PCR 法，该方法准确性高、重复性好（变异系数在 0.7%到 5.4%之间），通过对在欧洲、非洲和美洲不同地区收集的 44 个 ASFV 分离株进行验证，并没有发现与相关的猪病毒发生交叉反应。该方法检测灵敏度高于世界动物卫生组织推荐的常规 PCR 和 King 等^[58]建立的 qPCR 检测方法。Ronish 等^[59]建立了一种 LATE-PCR 法检测 ASFV，该方法可直接扩增大量单链 DNA，具有很高的灵敏度（1~10 个分子），不仅可以用于实验室检测还可用于便携式检测仪进行检测。

1.2.2.1.6 微滴数字 PCR（Droplet Digital PCR, ddPCR）

ddPCR 是一种高灵敏度、高精度的分子生物学技术，通过将样本分成大量微小的液滴，每个液滴中含有零个或一个目标分子，从而使得每个液滴的 PCR 反应达到指数级扩增，以达到能准确计数目标分子起始拷贝数或浓度的目的。Zhu 等^[60]基于 ASFV B646L 和 EP402R 基因建立了一种双重 ddPCR 检测方法，并表现出良好的线性关系（ $R^2 > 0.99$ ）。双重 ddPCR 的检测下限为每反应 52 个拷贝。该检测方法未与其他猪病毒（猪瘟病毒（CSFV）、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、猪流行性腹泻病毒（PEDV）、猪细小病毒（PPV）、日本乙型脑炎病毒（JEV）和猪圆环病毒 2 型（PCV2））发生交叉反应。Wu 等^[61]利用 ASFV 的 K205R 基因开发了一种 ddPCR 技术用于检测 ASFV。该方法展现了极高的检测灵敏度，达到了每反应 10 拷贝的病毒核酸，这一灵敏度是传统 qPCR 技术的 10 倍。ddPCR 尽管具有高灵敏度的优点，但其需要昂贵的仪器进行检测，成本有时高于 qPCR，并不适用于大规模检测 ASFV^[62]。

1.2.2.1.7 环介导等温扩增技术（Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP）

LAMP 是一种新型的核酸扩增方法，这种方法能在等温（通常为 60~65℃）条件下，通过酶的作用，在核酸模板的辅助下，使扩增产物逐渐积累，从而在短时间内完成核酸扩增。该方法简便、快速且具有高特异性的特点，已被应用

于病原微生物检测和传染性疾病预防诊断中^[46]。王宏燕等^[63]利用 ASFV p72 基因设计出 3 对扩增引物以及 1 条环介导等温扩增探针引物,从而创建了实时荧光的环介导等温扩增方法。该方法的灵敏度可达 1 pg/ μ L,且与 WAOH 推荐的 qPCR 方法高度一致。Wang 等^[64]设计了针对 ASFV p10 基因的 LAMP 引物,优化了反应体系,检测灵敏度为 30 拷贝/ μ L,通过检测多种猪病病毒和 ASFV 的 DNA 或 cDNA 验证该方法的特异性,表明了 LAMP 可特异性检测出 ASFV。然而,LAMP 易受气溶胶污染,引物设计较为复杂,使其应用范围受到了一定限制^[62]。

1.2.2.1.8 重组酶聚合酶扩增技术 (Recombinase polymerase amplification, RPA)

RPA 是一种新型的核酸恒温扩增技术,它以 T4 噬菌体核酸复制机制为原理,利用重组酶蛋白 (T4 uvsX)、单链结合蛋白 (T4 gp32) 和 DNA 聚合酶 (Bsu) 的作用,在体外完成核酸的恒温扩增反应。RPA 技术可以在 37~42°C 的恒定温度下实现指数扩增,无需对 DNA 样品进行热预处理,从而摆脱了精密温度循环系统的限制^[65]。Fan 等^[66]基于 RPA 和重组酶介导核酸扩增技术 (RAA) 建立了检测 ASFV 核酸的检测方法,该方法对 24 个基因型毒株普遍具有特异性,与 qPCR 的检测符合率高度一致。Wang 等^[67]通过融合 RPA 技术和横向流动检测技术 (LFD),成功开发了一种新型的金纳米颗粒试纸条,专门用于 ASFV 的现场快速诊断,这一技术被命名为侧向流动基因检测技术 (LFAD)。LFAD 在相对较低的反应温度下展现出出色的性能,仅需 30 min 即可实现对 CSFV 和 ASFV 的特异性识别,大大提高了诊断的效率和准确性,且检测限为 10^2 拷贝/ μ L。RPA 技术不需要昂贵的设备,反应时间极短,仅需 5 至 20 min。相较于 qPCR 技术,RPA 技术更加简便、迅速和经济实用。这使得 RPA 技术在实验室外的现场检测以及资源匮乏地区具有显著优势,成为这些场景中 ASFV 核酸扩增和检测的理想选择^[68]。

1.2.2.1.9 CRISPR/Cas 核酸检测技术

CRISPR/Cas 核酸检测技术通过特定的 Cas 蛋白从待检测的核酸样本中识别出与 CRISPR 序列中的间隔序列相匹配的目标序列。一旦识别到目标序列,Cas 蛋白就会发挥其切割功能,对目标核酸序列进行切割。这种切割最终导致目标

核酸序列的断裂,从而使其能够被检测到^[69]。该方法可以高效、特异性的检测目标核酸序列。Yang 等^[70]通过将 LAMP 技术与 CRISPR/Cas12a 系统相结合,成功开发出一种名为 LAMP-CRISPR 的检测方法,用于检测 ASFV p72 基因。该方法表现出极高的灵敏度,检测限可达 7 拷贝/ μL ,且与其他猪 DNA 或 RNA 病毒没有交叉反应,确保了检测结果的特异性。通过对临床样本的检测,该方法显示出与 qPCR 高度一致的结果,进一步验证了其准确性和可靠性。有研究表明,将 CRISPR/Cas12a 与 RPA 结合,能够提高检测 ASFV 的效率^[71]。与传统的核酸检测技术相比,CRISPR/Cas 核酸检测技术具有更高的灵敏度和特异性。同时,该技术还具有操作简便、快速和经济的特点,适用于实验室外的现场检测。

1.2.2.2 血清学检测技术

1.2.2.2.1 抗体 ELISA

ELISA 被认为是检测大量血清非常灵敏且合适的方法。该方法是诊断亚急性和症状不明显的 ASFV 感染猪最广泛使用的技术^[51,72]。ELISA 用于检测 ASFV 抗体包括间接 ELISA、竞争 ELISA、阻断 ELISA 和双抗体夹心 ELISA。Wang 等^[5]将 CP204L 基因克隆到表达载体 pET-30a 中,成功在大肠杆菌原核表达系统中表达可溶性 p30 蛋白,利用纯化的重组 p30 蛋白,开发了用于 ASFV 抗体检测的双抗体夹心 ELISA (DAS-ELISA)。该方法在临床样本检测中表现出良好的特异性、敏感性和重复性,且成本较低,生产周期短。Li 等^[73]筛选出 ASFV p30、p54 和 p72 基因,将其串联生成 His-p30-54-72 重组蛋白,基于此建立了一种间接 ELISA。使用该方法与商业 ASFV 抗体检测试剂盒共同检测 192 份临床样本,结果表明,与基于单个病毒蛋白的商业 ASFV 抗体检测试剂盒相比,该方法的阳性检出率分别增加了 4.7%和 14.6%。对未来 ASFV 临床诊断和疫苗免疫效果评估具有参考价值。

1.2.2.2.2 荧光免疫层析技术 (Fluorescent Immunoassay, FIA)

FIA 是一种基于抗体-抗原特异性识别的分析技术,通过荧光信号来检测和定量目标分子。该技术巧妙地将免疫荧光技术与免疫层析技术融为一体,既保留了操作简便、检测迅速和便携性强的传统优势,又通过引入荧光示踪增强技

术, 实现了对检测结果的精确量化, 从而显著提升了诊断的准确性和可靠性。Li 等^[74]将截短的 p54 蛋白与荧光微球结合作为示踪剂, 开发了一种检测 ASFV 抗体的荧光免疫层析试纸 (FICTS)。FICTS 对比商业 ELISA 试剂盒检测结果表明了高度的一致性, 并且与其他猪病毒抗体没有交叉反应。

1.2.2.2.3 免疫胶体金技术 (Immune Colloidal Gold Technique, ICGT)

ICGT 作为一种前沿的免疫标记技术, 其核心在于利用胶体金作为独特的示踪标记物, 以便在抗原抗体反应中发挥作用。胶体金的形成是通过氯金酸在还原剂的引导下, 聚合成特定尺寸的金颗粒, 这些金颗粒由于静电作用相互稳定, 进而形成一种稳定的胶体状态^[75]。ICGT 具有灵敏度高、操作简便、快速和经济等优点。张鑫宇等^[76]通过原核表达并纯化的 p54 重组蛋白建立了一种 ASFV p54 抗体胶体金检测方法, 与其他猪病毒阳性血清无交叉反应, 通过检测临床样品表明该方法对早期 ASFV 的检测优于 WOA 推荐的间接 ELISA 方法。

1.2.2.2.4 间接免疫荧光实验 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)

IFA 是一种基于抗原抗体反应和荧光标记技术用于检测抗体的技术。Heimerman 等^[77]开发了一组针对 ASFV p72 的 mAbs, 并通过 IFA 进行检测, 对筛选出的阳性抗体进行表征, 结果表明这些 mAbs 都位于 p72 中的高度保守区域, 对开发新的 ASFV 抗体和抗原检测方法提供了帮助。

1.2.2.2.5 间接免疫过氧化物酶技术 (Indirect Immunoperoxidase Test, IPT)

IPT 是一种细胞免疫化学技术, 通过利用耦联的过氧化物酶实现抗原抗体复合物的检测, 是 WOA 推荐的 ASF 血清学检测方法之一^[62]。Carmina 等^[78]用 ASFV 感染固定在细胞培养皿上的非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 一定时间作为抗原, 然后将待检样本与其一起孵育, 利用 IPT 技术检测, 阳性样本可观察到红褐色沉淀。在血清学诊断方面, IPT 检测 ASFV 抗体的敏感性高于 ELISA 和免疫印迹分析 (WB)。

1.3 单克隆抗体在诊断中的应用

单克隆抗体 (mAb) 是具有特异性靶点的免疫球蛋白, 由单个细胞克隆产生, 是一种具有高度均一性且仅针对某一特定抗原表位的抗体^[79,80]。1975 年,

Köhler 和 Milstein 开发了杂交瘤技术，奠定了单克隆抗体作为治疗药物的基础^[81]。该技术的发明使无限量单克隆抗体的生产成为可能^[82]。Köhler 和 Milstein 因此在 1984 年成为诺贝尔医学和生理学奖获得者，且二人于 1986 年生产的第一个 mAb 治疗药物（Orthoclone OKT3）被许可用于治疗移植物抗宿主病^[83]。

在临床试验领域，单克隆抗体技术展现出了迅猛的发展势头。得益于其强大的特异性、出色的稳定性以及单一的生物活性等特点，单克隆抗体技术被广泛运用于生物学免疫试验和医学免疫检验^[84]，在治疗器官移植过程中的免疫排斥反应、感染性疾病的治疗以及肿瘤治疗等方面均发挥了关键作用^[85]。此外，它还还为疾病的诊断和预防提供了帮助^[86,87]。

ASFV mAbs 在免疫学相关 ASFV 检测方法的建立中起到了关键作用。它可用于建立检测 ASFV 抗原的直接免疫荧光试验（DIF）、免疫组化试验、夹心 ELISA 等^[88]。这些检测方法对于非洲猪瘟的快速诊断具有重要意义。mAbs 因其独特的性质，在非洲猪瘟的研究和诊断中展现出显著的优势。这些抗体不仅具备高纯度和高灵敏度，能够精确识别目标病原体，而且其特异性极强，几乎不与其他病毒或抗原发生交叉反应。此外，相较于其他方法，单克隆抗体的制备成本较低，这使得它在研究和诊断中更具经济性。有研究表明^[89]，某些特定的单克隆抗体，如 p30 和 p54 单克隆抗体，能特异性识别 ASFV 感染细胞中表达的病毒蛋白，并具有一定的阻断效果。基于单克隆抗体的高度特异性，研发出的试剂盒不仅可检测多种 ASFV，更能精准识别特定血清型或基因型的 ASFV，大大增强了检测的准确性^[90,91]。随着技术的不断进步，单克隆抗体技术日趋完善，其应用领域也在不断拓宽。因此，深入研究其制备方法、开发新型单抗并进一步扩大其应用范围，具有巨大的潜力和广阔的前景^[47]。

1.4 化学发光免疫分析技术

化学发光免疫分析（CLIA）是一种将高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合的技术，用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶和药物等的检测分析。该技术是在继放免分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。

1.4.1 化学发光原理

CLIA 是 1977 年 Halmann 等^[92]在放射免疫分析 (RIA) 和酶免疫分析 (EIA) 理论的基础上, 通过加入化学发光技术建立起来的, 该技术由免疫反应系统和化学发光分析系统组成, 其中化学发光反应系统是化学发光物质在催化剂的作用下发生氧化还原反应, 使化学发光剂分子获得能量, 从基态跃迁到激发态, 但处于激发态的分子不稳定, 当激发态分子重新跃迁到基态时会伴随着以光子的形式释放出能量, 从而产生化学发光。CLIA 消除了放射性污染, 并以其高的敏感性、低的干扰、宽的线性范围等优点, 被广泛应用于诊断检测中^[93]。

1.4.2 化学发光分类

CLIA 近年来在生命科学、临床诊断、食品安全和药物分析等领域得到了广泛的应用。CLIA 根据反应原理和标记物的不同可分为根据标记物的不同可分为三大类, 即化学酶免发光体系 (Chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)、电化学发光免疫分析法 (Electro chemiluminescence immunoassay, ECLIA) 和直接化学发光体系 (Direct chemiluminescence immunoassay, DCLI)^[94,95]。

1.4.2.1 CLEIA

CLEIA 结合了酶免疫分析和化学发光分析的优势, 用可催化化学发光的酶如辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP) 标记抗原或抗体, 与待检样品中的抗体或抗原特异性结合形成抗原-抗体复合物, 随后通过加入特定的化学发光底物 (如鲁米诺、发光氨等) 来触发发光反应, 利用发光信号测量仪测量光量子产额, 从而确定抗原-抗体复合物的含量, 进而推断出待测物的浓度。刘伟等^[94]通过开发基于口蹄疫病毒 O 型 VP1 的重组多表位蛋白的间接 CLIA 试剂盒, 成功实现了猪 O 型口蹄疫病毒抗体的快速检测, 并显示出比市售 ELISA 试剂盒更高的灵敏度和检出率。Ashenagar 等^[96]的研究则利用 CLEIA 技术监测 SARS-CoV-2 疫苗接种后的抗体反应, 特别是在抗体水平较低时, CLEIA 相较于 ELISA 显示出更好的灵敏度。Salvagno 等^[97]的研究通过自动 CLEIA 技术快速检测 SARS-CoV-2 的抗原, 以评估鼻咽拭子或唾液中的核衣壳蛋白, 结果表明

CLEIA 在检测 SARS-CoV-2 抗原方面具有高灵敏度和特异性，是一种可靠的检测方法。

1.4.2.2 ECLIA

ECLIA 发光原理是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，实际上包含了化学发光（CL）与电化学发光（ECL）的两个过程。ECLIA 是一种基于电化学反应启动化学发光反应的检测技术，它在化学发光免疫分析的基础上进行了继承和发展^[98]。该技术结合了电化学反应和化学发光反应两个过程，其中三联吡啶钌 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 是应用最广泛的标记物^[99]。Kolesova 等^[100]利用 ECLIA 检测 SARS CoV 2 抗原，结果展现出 85%的敏感性和 100%的特异性，表明 ECLIA 是一种快速筛查高 SARS-CoV-2 病毒载量患者的合适方法。Tiwari 等^[101]利用 ECLIA 对人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)的 TTD 标记物进行检测，结果表明 ECLIA 对这三种 TTD 标记的灵敏度高达 100%。在特异性方面，ECLIA 对 HIV 的特异性为 99.85%，HCV 为 99.84%，HBV 为 99.70%。另一项由 Teimouri 等^[102]进行的研究中，ECLIA 被用于检测人血清中的抗弓形虫 IgG，并与 ELISA 进行了对比。该研究表明，ECLIA 在样品检测速度、敏感性以及特异性上均优于 ELISA，因此更适合作为查找人血清中弓形虫的血清学筛选方法。尽管电化学发光技术因其独特的机理而具有出色的重复性和高灵敏度等优点，但 ECLIA 检测的成本高，需要昂贵的设备和试剂，限制了其在现场，特别是在农村地区或资源有限的实验室中广泛应用。

1.4.2.3 DCLI

DCLI 是一种高效的免疫分析技术，其特点在于将发光物质直接标记在抗原或抗体上，无需依赖电催化或酶催化过程。在碱性条件下，这些标记物能够直接释放光子，从而产生高强度的光信号。这种技术相较于传统的 ELISA 方法，在多个方面展现出了显著的优势。Kombe Kombe 等^[103]成功研发了一种基于 DCLI 的诊断试剂盒，旨在精确测定水痘-带状疱疹病毒（VZV）特异性免疫球蛋白的滴度。这种诊断方法对于 VZV-糖蛋白 E 的特异性 IgA、IgG 和 IgM 的检测，分别展现出了 95.2%、95.2%和 97.6%的敏感性，同时其特异性分别高达 98.0%、

100%和 98.9%。将 IgM 检测与 IgG 和 IgA 检测相结合，显著提升了诊断的准确度。除此之外，在免疫球蛋白滴度极低的情况下，DCLI 的诊断方法相比传统的 ELISA，不仅更为敏感，而且在特异性方面也有更好的表现。

当 CLIA 与全自动化的检测分析仪器相结合时，其优势更为明显。全自动化的仪器能够自动完成样本处理、标记、检测和数据分析等步骤，大大提高了检测效率。此外，这种自动化过程还减少了人为操作上的误差，使得检测结果更加可信。Liu 等^[104]研发了一种高效、特异的自动 CLIA 技术，用于检测 SARS-CoV-2 中和抗体 (NAbs) 的水平。该研究结果表明，这种测定方法不仅可用于 SARS-CoV-2 感染的诊断和治疗评估，还可用于疫苗效果的评估。作为一种综合性检测技术，CLIA 已在多个不同的检测领域中逐渐崭露头角，成为分析技术中的重要力量，并持续发挥着举足轻重的作用。并且，随着近些年来一些新技术，如磁珠、试纸条层析、毛细管电泳以及高效液相色谱等的不断发展，使化学发光技术更加先进与完善，极大的增加了敏感性与特异性，并缩短了检测时间与检测费用^[105]。

1.5 研究目的和意义

ASF 是一种可以给家猪及野猪带来极大危害的动物疫病。2018 年 8 月，在我国辽宁省首次暴发非洲猪瘟，该病在全国迅速传播，造成了重大经济损失。然而，ASFV 的不断进化，使得出现中等毒力基因 II 型毒株以及基因 I 型弱毒株，导致发病猪出现持续性和慢性感染，因此特异性抗体的检测对于疫病的检测诊断尤为重要，所以开发一种快速、灵敏的检测 ASFV 抗体的方法势在必行。目前市场上用于检测 ASFV 抗体的试剂盒都基于蛋白/单抗的 ELISA 试剂盒，存在检测时间长、敏感性差的问题。本研究利用原核表达系统表达了 p30 重组蛋白，并使用杂交瘤技术制备了 p30 单克隆抗体，通过 WB、ELISA、间接免疫荧光试验分析单抗的生物学特性，从而筛选出识别表位高度保守的单抗，然后利用其建立了检测 p30 抗体的竞争 CLIA 法 (p30-cCLIA)，为及时控制 ASF 传播及流行病学调查提供了可靠的工具。

第二章 p30 蛋白表达和 p30 单克隆抗体制备

在高毒力 ASFV 流行并导致急性疾病和高死亡率的情况下，受感染的猪还未产生针对 ASFV 的抗体就已死亡，因此及时的核酸检测至关重要。在低毒力毒株感染情况下，非洲猪瘟特异性抗体检测成为清除受感染猪的一种非常可行且简单的方法。ASFV p30 是感染早期产生的最具免疫原性的蛋白质。因此，更好地了解 ASFV p30 抗原特性，为早期 ASFV 抗体检测方法的建立奠定基础。在这项研究中，我们利用原核表达系统成功表达了 p30 重组蛋白，然后将纯化的 p30 重组蛋白免疫小鼠，通过杂交瘤融合技术获得了 20 株针对 ASFV p30 的单克隆抗体 (mAbs)。这为进一步拓展 p30 表位图谱以及开发新的检测方法提供了材料。

2.1 材料

2.1.1 细胞、质粒及实验动物

细胞：骨髓瘤细胞 (SP2/0)、仓鼠肾细胞 (BHK-21) 由本实验室保存；

质粒：pET-28a 载体质粒由本实验室保存；

实验动物：6-8 周龄与 10-12 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

2.1.2 主要试剂

PEG-2000、HAT Supplement (50×) 培养基、HT Supplement (50×) 培养基、考马斯亮蓝 R-250、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (Sigma)，IPTG (索莱宝)、小鼠腹水佐剂 (博奥龙)，弗氏完全/不完全佐剂 (Sigma)、SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒 (Southern Biotech)，四甲基联苯胺 TMB (Bioassary 公司)，咪唑、尿素、丙烯酰胺 (上海生工)。

2.1.3 常用试剂配制

氨苄青霉素 (Amp⁺，配置浓度为 100 mg/mL)：称取 2 g 氨苄青霉素，加入 ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后用 0.22 μm 滤器过滤于 -20℃ 保存。

卡那霉素 (Kan⁺，配置浓度为 50 mg/mL)：称取 1 g 卡那霉素，加入

ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后用 0.22 μm 滤器过滤于-20℃保存。

IPTG 诱导剂 (1 M)：称取 4.77 g IPTG，加入 ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后用 0.22 μm 滤器过滤分装在 20 个 1.5 mL EP 管中于-20℃保存。

LB 液体培养基 (1 L)：称取 5 g 酵母提取物，10 g 胰蛋白胨，5 g NaCl，加入 ddH₂O 溶解后定容至 1 L，高压蒸汽灭菌，室温保存。

LB 固体培养基 (500 mL)：称取 2.5 g 酵母提取物，5 g 胰蛋白胨，2.5 g NaCl，7.5 g 琼脂粉，加入 ddH₂O 溶解后定容至 500 mL，高压蒸汽灭菌，待温度降至 60℃左右时，加入相应抗生素，倒板，4℃保存。

10×SDS-PAGE 电泳缓冲液：称取 Tris 30.2 g、SDS 10.0 g、Glycine 188 g 放置在 1 L 的烧杯中，加入 800mL ddH₂O 进行溶解，然后定容至 1 L，室温保存（使用稀释度为 1×SDS-PAGE）。

考马斯亮蓝 R-250 染液：称取 1 g 考马斯亮蓝 R-250，然后加入 250 mL 异丙醇、100 mL 冰醋酸和 650 mL ddH₂O 充分搅拌混匀。

脱色液：量取 400 mL 乙醇、200 mL 乙酸和 400 mL ddH₂O 搅拌混匀，室温放置备用。

转膜缓冲液：取购买的 10×转膜液 100 mL，加入 200 mL 甲醇和 700 mL ddH₂O，4℃保存备用。

WB 封闭缓冲液 (5%脱脂乳)：称取 5 g 的脱脂奶粉，加入 1×PBST 振荡混匀，定容至 100 mL，4℃保存备用。

2.1.4 实验仪器

Nano Drop 紫外-可见分光光度计、恒温培养箱、ECL Western Blotting Substrate、酶标仪 (Thermo Fisher, 美国)，凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国)，PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)，高压灭菌器 HVE-110 (Hirayama, 日本)，ZQZY-85BN 震荡培养箱 (上海知楚仪器有限公司)，AIRTECH 双面超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)，蛋白电泳仪、电泳槽 (Bio-Rad, 美国)，数显恒温水浴锅 (青岛聚创环保设备有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 目的基因合成及构建重组质粒

从 GenBank 数据库 (GenBank MH766894.1) 中检索 p30 基因, 在 5' 加入酶切位点 *EcoR I*, 3' 端加入酶切位点和 *Sal I*, 然后连接至 pET-28a 载体, 并委托上海生工生物有限公司合成重组质粒 (pET-28a-p30)。

2.2.2 p30 重组蛋白的表达及纯化

2.2.2.1 p30 蛋白的表达

(1) 将经过验证正确的 pET-28a-p30 重组质粒转入感受态细胞 BL21 (DE3) 中, 轻轻混匀, 冰育 30 min;

(2) 42°C 恒温水浴锅中热激 60 s, 然后冰上孵育 3 min;

(3) 加入 500 μ L 的无抗 LB 培养基, 37°C 220 rpm 转速振荡孵育 45 min;

(4) 吸取 100 μ L 的菌液无菌涂在含有 Amp⁺ 抗性的 LB 琼脂板上, 37°C 恒温培养箱中倒置培养过夜;

(5) 从平板上挑选一个生长状态良好的独立菌落, 然后将其接种到含有 Amp⁺ 抗性的 LB 培养基中;

(6) 然后, 将接种了菌落的 LB 培养基放入设定在 37°C 的恒温摇床中, 以 220 rpm 的转速进行振荡培养, 以促进菌落的均匀生长和繁殖;

(7) 当菌液生长至一定密度时 (OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8), 加入诱导剂 IPTG, 继续振荡培养;

(8) 将培养温度降至 16°C, 继续振荡培养 20 h, 以促进重组蛋白的表达。

2.2.2.2 p30 蛋白表达形式的验证

将菌液以 5,000rpm 的转速离心 10 min, 收集上清液和菌体, 收集好的菌体用缓冲液 (1×PBS) 重悬, 在冰上 250 W 超声破碎 30 min, 然后离心收集超声后的细菌裂解液的上清和沉淀, 最后通过 SDS-PAGE 电泳验证其表达形式。

2.2.2.3 p30 蛋白的纯化

将超声裂解后的菌体重悬于 IB 增溶缓冲液 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 8 M 尿素, pH 8.0) 中, 并在 4°C 下旋转溶解过夜。离心后收集上清液, 将上清液加入到 Ni-NTA 柱中进行纯化, 利用重组蛋白与 Ni-NTA 柱的特异性结合进行分

离；用洗脱液洗脱结合的重组蛋白，收集洗脱液。然后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析洗脱蛋白的纯度：

- (1) 取适量样品于 1.5 mL ep 管中，按照适当的比例加入蛋白上样缓冲液，轻轻摇晃混匀；
- (2) 将混合后的样品放至 100℃ 的恒温水浴锅中加热 10 min，使蛋白变性；
- (3) 根据实验需求，制备 12% 的 SDS-PAGE 凝胶，将制备好的凝胶放入电泳槽中，加入适量的电泳缓冲液；
- (4) 将制备好的样品冷却至室温后，使用 10 μ L 移液枪将样品加入凝胶的加样孔中；
- (5) 接通电源，恒压 80 V 工作 30 min，然后将电压调至 120 V 工作 60 min；
- (6) 电泳结束后，取出凝胶，放入新配制的考马斯蓝染色液中染色 10 min；
- (7) 染色完成后，将凝胶从染色液中取出，随后将其放入脱色液中，并将脱色液与凝胶一同置于振荡仪上进行摇动脱色，直到凝胶的背景变得清晰，且所需的条带能够清晰地显现；
- (8) 对脱色后的凝胶进行拍照或扫描，记录实验结果；
- (9) 分析凝胶上的条带，确定目标蛋白的位置和纯度；

2.2.2.4 p30 重组蛋白复性

(1) 对纯化的蛋白进行透析复性。将纯化的蛋白装入透析袋中，并依次在复性缓冲液 1、复性缓冲液 2 和复性缓冲液 3 中进行梯度复性：

a、在复性缓冲液 1（4 M 尿素，200 mM 咪唑，20 mM Tris，250 mM NaCl 缓冲液，0.1% Triton-100，pH 8.0）中 4℃ 复性 12 h。

b、然后转移到复性缓冲液 2（2 M 尿素，100 mM 咪唑，20 mM Tris，250 mM NaCl，0.1% Triton-100，pH 8.0）中复性 12 h。

c、再转移到复性缓冲液 3（20 mM Tris，250 mM NaCl，0.1% Triton-100，10% 甘油，0.4 M 精氨酸，2 mM 还原型谷胱甘肽，0.2 mM 氧化型谷胱甘肽，pH 8.0）中复性 12 h。

(2) 复性完成后，将重组蛋白分装并存放于 -20℃ 冰箱中，以备后续使用。

2.2.3 p30 单克隆抗体的制备

2.2.3.1 免疫动物

将 p30 重组蛋白与等比例的弗氏完全/不完全佐剂乳化，并对 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠小鼠（20 μg p30/只）进行免疫，具体免疫程序如表 2-1 所示：

表 2-1 免疫程序

Table 2-1 Immunization program

时间	途径	剂量
0 d	肌肉免疫	20 μg
14 d	肌肉免疫	20 μg
28 d	肌肉免疫	20 μg
42 d	腹腔免疫	50 μg

2.2.3.2 杂交瘤细胞的制备

腹腔冲击免疫 3 d 后，取脾细胞与 SP2/0 细胞融合，并提前 1 d 制备饲养层细胞。

制备饲养层细胞步骤：首先将饥饿 2~3 h 的小鼠采用脱颈法处死，然后将其迅速放入 75%酒精浸泡消毒 5 min；随后用干净的纸巾擦干酒精并将小鼠固定在特质的鼠架上，然后用高压的剪刀镊子分离小鼠的皮肤与腹膜，直至腹膜完全暴露；使用 10 mL 注射器吸取 8 mL HAT 培养基，将针头轻轻刺入小鼠腹膜并缓慢地反复抽吸，待注射器中液体逐渐变为微黄色后迅速拔出针头并摘下，然后将注射器中的液体缓慢注入提前备好的平皿中，操作全程在无菌条件下完成。

细胞融合具体步骤：将小鼠眼球摘除采取阳性血，放于 4℃过夜分离血清；然后将小鼠脱颈处死，无菌条件下取出脾脏并将其研碎；使用细胞筛过滤脾细胞碎片，去除较大的组织块，收集脾细胞悬液；将状态良好且处于对数生长期的 SP2/0 细胞与脾细胞按 5~10:1 的细胞比例混匀，离心后弃上清，将细胞沉淀轻轻拍散，缓慢滴入 1 mL PEG 融合剂。然后缓慢加入 25 mL 无抗 DMEM 培养基，离心后弃去上清。将细胞沉淀用含有 HAT Supplement 的 DMEM 培养基重悬，然后加入到铺有饲养层细胞的 96 孔培养皿中培养。培养过程中观察细胞生长情况，挑取阳性细胞孔并用有限稀释法亚克隆三次。培养 7~10 d 后，收集细

胞上清液。

间接 ELISA：使用碳酸盐缓冲液（CBS）将 p30 重组蛋白稀释至浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ，确保稀释过程中操作准确，100 μL /孔加入 ELISA 板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；将稀释好的杂交瘤细胞上清液或腹水单抗加入到已经孵育好 p30 重组蛋白的孔中，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min；PBST 洗 5 次，拍干；将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体按照 1:10000 的比例进行稀释；之后，在每个孔中均匀地加入 100 μL 稀释后的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应 30 min；使用 PBST 清洗 5 次，然后拍干；加入 TMB 显色液 50 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min；加入终止液 50 μL /孔，并使用酶标仪测量 450 nm 的 OD 值。

2.2.3.3 腹水的制备与纯化

（1）将 0.3~0.5 mL 腹水佐剂通过无菌操作注入 12 周龄的雌性 BALB/c 小鼠腹腔；

（2）在注射试剂的第 14 d，将约 1.0×10^6 个细胞状态良好的杂交瘤细胞轻轻注射到小鼠腹腔内；

（3）在注射杂交瘤细胞后的 9~10 d，收集小鼠腹水；

（4）采用亲和层析法（HiTrap Protein G，GE，GA，美国）纯化腹水，将腹水样品上样到预先准备好的亲和层析柱上；

（5）根据层析柱的使用说明，通过蛋白纯化仪逐步洗脱非特异性结合的杂质，直到收集到纯度较高的单抗；

（6）将收集的单抗取少量进行 SDS-PAGE 电泳，剩下的置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.3.4 单克隆抗体的亚型鉴定

利用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒对单克隆抗体进行亚型鉴定，具体操作为：准备 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒以及相应的包被有 p30 重组蛋白的 ELISA 板；将稀释的单抗加入到已包被 p30 的 ELISA 板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min；加入 1:1000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG（IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3）、IgM、IgA 以及 λ 、 κ ，继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min；PBST 清洗 ELISA 板 3 次，拍干；

向每个孔中加入 100 μ L 显色液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; 使用酶标仪测量每个孔在 450 nm 处的 OD 值。根据 OD 值的大小可以判断单抗的亚型。

2.3 结果

2.3.1 p30 重组蛋白的表达纯化与鉴定

p30 重组蛋白通过大肠杆菌原核表达系统诱导表达, SDS-PAGE 验证该蛋白的表达形式为包涵体, 分子量约为 30 kDa, 与预期大小一致。表达的重组蛋白经 Ni-NTA 纯化, 通过 SDS-PAGE 验证洗脱蛋白的纯度, 可见纯化后无其它杂带, 纯化效果较好 (图 2-1)。将纯化复性后的 p30 重组蛋白免疫小鼠, 获得了 20 株能稳定分泌 p30 特异性抗体的杂交瘤细胞。

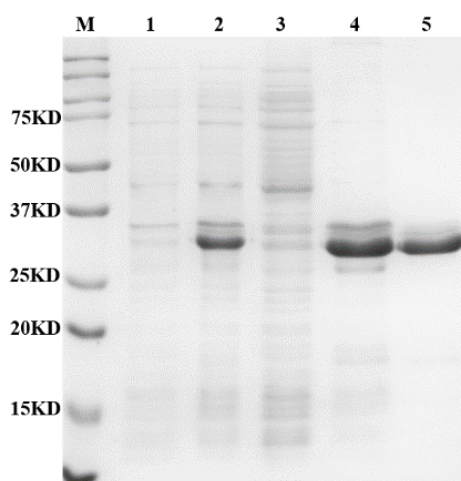


图 2-1 p30 重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 2-1 SDS-PAGE analysis of purified p30 recombinant protein

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 诱导前的细菌裂解液; 2: 诱导后的细菌裂解液; 3: 超声裂解细菌后的上清液; 4: 超声裂解细菌后的沉淀; 5: 纯化的 p30 重组蛋白

M:Protein molecular weight standard; 1:Bacterial lysate before induction; 2:Bacterial lysate after induction; 3:Supernatant after ultrasonic lysis of bacteria; 4:Precipitate after ultrasonic lysis of bacteria; 5:Purified p30 recombinant protein

2.3.2 单克隆抗体的纯化

单克隆抗体经 Protein G 亲和层析柱纯化后, 通过 SDS-PAGE 分析单抗纯度, 结果显示了两条目的条带, 单克隆抗体经 β -巯基乙醇或 SDS 还原后, 破坏了重

链和轻链间的二硫键，从而产生了分子量分别约为 48 kDa 的重链和 25 kDa 的轻链，并且由图 2-2 可见纯化后的单抗纯度较高，符合后续实验的要求。

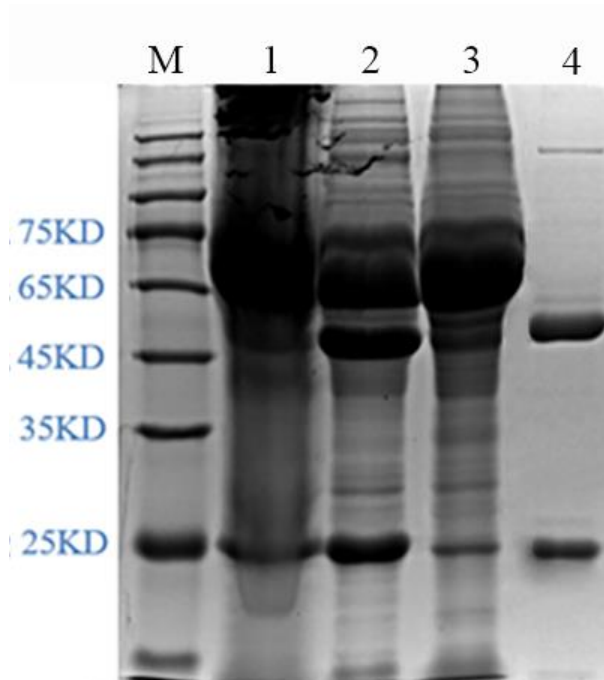


图 2-2 mAb 纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 2-2 SDS-PAGE analysis of mAb purification

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 腹水; 2: 腹水 5 倍稀释; 3: 流穿液; 4: 纯化的单抗

M:Protein molecular weight standard; 1:Ascites; 2:5-fold dilution of ascites; 3:flow through liquid; 4:Purified monoclonal antibody

2.3.3 20 株单克隆抗体的亚型鉴定

利用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒对获得的 20 株单克隆抗体进行亚型鉴定，结果表明，1-1D2B3、2-1B3G3、3-1E3G11、5-1C8B6、7-1C11F4、8-2B4A3、11-2E1D9、12-3B2G5、13-3D2H8、14-3D4C6、16-5E7E8、18-6B4C10、Q1-1G4B2、Q3-1C9F6、Q4-1F10B7 和 Q8-4F9F3 为 IgG1 亚类，4-1D4C9、10-2D7F6 和 17-5C11E3 为 IgG2a 亚类，15-4B9H10 为 IgA 亚类。20 株单抗具有 κ 类型的轻链（表 2-2）。

表 2-2 20 株单克隆抗体的亚型鉴定

Table 2-2 Subtype identification of 20 mAbs

mAbs	Light chains	mAbs subclass
2-1B3G3	k	IgG1
3-1E3G11	k	IgG1
4-1D4C9	k	IgG2a
10-2D7F6	k	IgG2a
13-3D2H8	k	IgG1
14-3D4C6	k	IgG1
18-6B4C10	k	IgG1
7-1C11F4	k	IgG1
11-2E1D9	k	IgG1
12-3B2G5	k	IgG1
17-5C11E3	k	IgG2a
Q3-1C9F6	k	IgG1
16-5E7E8	k	IgG1
1-1D2B3	k	IgG1
8-2B4A3	k	IgG1
15-4B9H10	k	IgA
Q4-1F10B7	k	IgG1
5-1C8B6	k	IgG1
Q1-1G4B2	k	IgG1
Q8-4F9F3	k	IgG1

2.4 讨论

ASF 给全球生猪及相关产业造成了巨大损失，目前还没有商业化的 ASF 疫苗^[106]，因此快速准确的诊断技术对于非洲猪瘟的防控至关重要。目前，p30、

p54、p72 等因其高免疫原性和抗原性，常被用作血清学诊断靶点。而其中 p30 在病毒感染后 2~4 h 表达，是 ASFV 的主要结构蛋白^[21]，是检测 ASFV 感染后抗体的主要靶点^[107]，因此本研究通过原核表达 ASFV p30 蛋白，并将其免疫小鼠，将脾细胞和骨髓瘤细胞融合制备了 20 株 p30 mAbs。

在体外表达蛋白的各种方法中，利用原核表达系统获取目的蛋白是一种常见且有效的方法。其中，大肠杆菌表达系统因其操作简便、培养周期短以及目的基因表达水平高等优点，成为了重要的原核表达体系之一。在本研究中，通过筛选和优化原核表达载体和 p30 基因序列，利用大肠杆菌表达系统表达全长的 p30 重组蛋白，并用其制备 mAbs，较短时间内获得大量的表达产物，且成本相对低廉。

单克隆抗体是对抗原或表位具有高度特异性的免疫球蛋白，具有特异性强、纯度高、灵敏度高、易大量生产和成本低等优点，因此具有广泛的临床和医疗用途，在兽医诊断和治疗中发挥着重要作用。将单克隆抗体应用于诊断中可以提高诊断敏感性和特异性，此外，识别的中和表位的单克隆抗体能够起到中和病毒的作用，其作为中和抗体能够提高攻毒后猪的存活率^[108]。然而有研究表明，即使存在中和抗体也不能完全中和 ASFV，不能被中和的病毒约占 4%~13%^[109]。这可能与 ASFV 感染后，由非中和抗体导致的 ADE 效应有关^[110]。总之，筛选和鉴定识别 ASFV 的中和表位的单克隆抗体有助于 ASFV 亚单位疫苗以及诊断方法的开发，并且能够帮助拓展 ASFV 表位图谱，同时对抗病毒策略的开发也至关重要。

2.5 本章小结

- (1) 通过大肠杆菌原核表达系统成功表达并纯化 p30 重组蛋白；
- (2) 将纯化的 p30 重组蛋白作为免疫原免疫 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，利用经典杂交瘤细胞技术成功制备了 20 株 ASFV 单克隆抗体。

第三章 20 株 ASFV p30 单克隆抗体识别表位的鉴定

表位的鉴定对于在分子水平上了解病毒的抗原结构、宿主对感染的免疫应答具有重要意义，因此，通过单克隆抗体鉴定抗原表位成为研究抗原结构的有力工具。本研究获得了 20 株 p30 单克隆抗体并通过 IFA 和 WB 对其生物学特性进行研究，IFA 结果表明，除 12-3B2G5、17-5C11E3、Q3-1C9F6、16-5E7E8、8-2B4A3、15-4B9H10、5-1C8B6 之外，另外 13 株 mAbs 都识别 ASFV；WB 结果表明，除两株单克隆抗体（Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3）不与 ASFV 反应及四株（1-1D2B3、51C8B6、8-2B4A3 和 15-4B9H10）与 ASFV 反应性较差，其余单克隆抗体均与 ASFV 反应性较好。然后通过化学发光相加法和 WB 将 20 株单抗分为 11 组，并通过 p30 截短重叠肽、丙氨酸突变以及 N 端和 C 端截短蛋白确定了单抗识别的最小表位，其中组 I-1、I-2、II-1、III、IV 和 V 识别的最小表位为 137aa~194aa，组 II-2 识别的最小表位为 154aa~190aa，Q4-1F10B7 识别的“¹¹⁶TSSFETLFEQ¹²⁵”是线性表位，Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 可能识别构象依赖性表位。序列比对结果表明第 VI 组中 mAb 识别的表位存在 1 个氨基酸的变异，第 I-1、I-2、II-1、II-2、III 和 V 组中 mAbs 识别的表位相对保守，仅在某些 ASFV 分离株中存在 Met¹³⁹、Thr¹⁴⁴、Tyr¹⁷¹、Thr¹⁷³ 和 Val¹⁸² 的突变，且这些突变不是关键氨基酸突变。

3.1 材料

3.1.1 质粒、菌株和细胞

质粒：pGEX-4T-1 和 pET-28a 载体质粒均由本实验室保存。

菌株：ASFV/II/CN/SC/2019 菌株保藏于兰州兽医研究所 P3 生物安全实验室。

细胞：从健康猪的肺组织中分离的原代猪肺泡巨噬细胞（PAM）储存在液氮中。

3.1.2 实验试剂

限制性内切酶 *EcoRI*、*SalI*（北京 NEB 有限公司），四甲基罗丹明异硫氰酸酯（TRITC）标记的山羊抗鼠 IgG（英国 Abcam 公司），SteadyPure Virus DNA /

RNA Extraction Kit 和 Pro Taq HS Premix Probe qPCR Kit (湖南 ACCURATE BIOLOGY 公司), 聚偏二氟乙烯膜 (美国 Bio-Rad), TMB (Bioassary 公司)。

3.1.3 实验仪器

荧光显微镜、M16000B 倒置显微镜 (Leica 公司, 德国), 成像系统(NE, 美国), 分光光度计, Varioskan Lux 仪器 (Thermo Fisher, 美国)。

3.2 实验方法

3.2.1 IFA

将 PAM 细胞用含 15%胎牛血清的 RPMI1640 培养基铺至 12 孔板中, 然后用 0.1 MOI 的 ASFV/II/SC/2019/S 感染 48 h。感染结束后, 弃细胞培养液, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 之后用 0.1%Triton X-100 透膜 10 min。用 2%牛血清白蛋白封闭 1 h, 然后将杂交瘤细胞上清液按 1:20 稀释, 与 TRITC 偶联的羊抗鼠抗体按 1:1000 稀释孵育 1 h。最后用 DAPI 对细胞核进行染色, 并用荧光显微镜观察染色结果。

3.2.2 Western blot

将等量的上述融合蛋白与 4×上样缓冲液混合并用沸水加热 10 mi。用 10% 或 15%Tris-Glycine 凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, 并印迹至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。使用 1×PBST 配制的 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入杂交瘤的上清液 (用 1×PBST 以 1:20 的比例稀释), 并在 4℃下过夜孵育。用 1×PBST 洗涤 5 次, 之后加入 1:10000 稀释度的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体, 在室温下孵育 1 h。清洗后, 将膜与化学发光试剂孵育, 并使用成像系统进行分析。

3.2.3 间接 CLIA 和间接 ELISA

将稀释在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 中的 p30 蛋白以 100 μL/孔的量添加至 96 孔化学发光板 (用于 CLIA) 或 96 孔聚苯乙烯板 (用于 ELISA) 中, 并在 4℃下孵育过夜。使用 1×PBST 洗板 5 次后, 加入封闭缓冲液, 并在 37℃下孵育 2 h。将杂交瘤细胞培养上清液稀释后加入 96 孔板, 并将其置于 37℃孵育 30 min; 接着加入 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG, 37℃孵育 30 min。1×PBST 洗涤 5 次, 在间接 CLIA 中加入化学发光底物 (Key-Bio) 100 μL/孔, 反应 5 min

后, 使用 Varioskan Lux 仪器测量 CL 信号; 在间接 ELISA 中, 加入 TMB 50 μ L/孔, 并在 37°C 反应 10~15 min, 然后加入 50 μ L/孔 2 M H_2SO_4 终止反应, 并使用分光光度计在 450 nm 处测量光密度 (OD) 值。

3.2.4 化学发光相加法

为了初步确定 20 种单克隆抗体 (mAbs) 识别的不同表位, 我们通过化学发光相加法替代 ELISA 分类单抗^[111,112]。首先, 将第一种杂交瘤的上清液稀释并加入到包被了 p30 蛋白的化学发光板上, 在 37°C 下孵育 30 min; 使用 1×PBST 洗涤后, 加入第二种杂交瘤的上清液, 并在 37°C 下孵育 30 min。接着加入 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG, 37°C 下孵育 30 min; 1×PBST 洗涤 5 次, 然后加入化学发光底物 100 μ L/孔, 反应 5 min 后, 使用 Varioskan Lux 仪器测量 CL 信号。

为了定量分析 CLIA 相加法测试的实验结果, 根据公式为一对抗体定义了一个相加性指数 (AI): $AI = (2 \times A_{1+2} / (A_1 + A_2) - 1) \times 100$

其中, A_1 指第一种单克隆抗体单独作用时的化学发光 (CL) 值, A_2 指第二种单克隆抗体单独作用时 CL 值, A_{1+2} 指两种单克隆抗体一起作用时的 CL 值。理论上, 当第一个单克隆抗体饱和地结合到抗原上后, 然后加入识别相同的表位的第二个单克隆抗体, 第二个单克隆抗体将不会结合到抗原上, 从而使得化学发光值不会随着第二个单克隆抗体的加入而增加, 因此加和性指数 (AI) 将趋于零。相反, 如果两种抗体结合不同的表位, 则 CL 值随着第二单抗的加入而增加。

3.2.5 p30 肽片段的表达

为了定位 20 株单克隆抗体识别的表位, 基于全长 p30 基因设计了一系列重叠肽 (图 3-1), 并将其连接到 pGEX-4T-1 表达载体中, 构建重组质粒。经 DNA 测序分析验证后, 将重组质粒转化至感受态细胞 BL21 (DE3) 进行诱导表达, 16°C 培养 20 h, 1,0000 rpm 离心, 弃上清, 菌体沉淀用 PBS 重悬后, 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 和 WB。

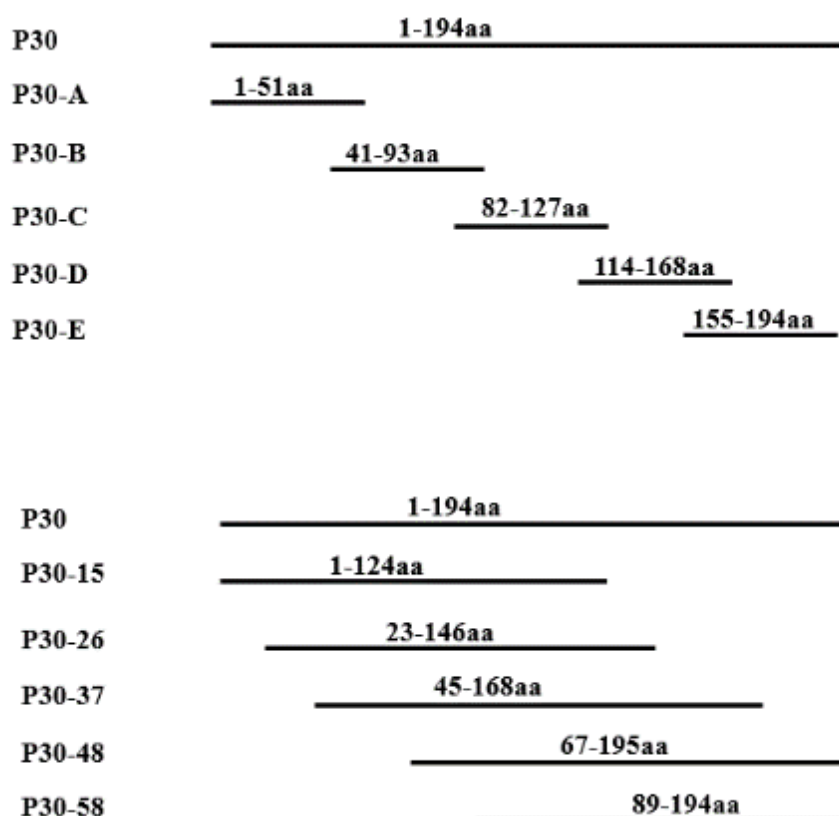


图 3-1 p30 重叠肽片段示意图

Figure 3-1 Diagram of overlapping fragments of p30

3.2.6 序列比对

为了验证 11 组单抗识别的表位在不同 ASFV 分离株间的保守性，从 200 多个 p30 序列中挑选了 17 个具有代表性的 p30 序列用 BioEDIT 软件（7.2.5 版）进行分析和比对。

3.3 实验结果

3.3.1 20 株单克隆抗体的反应性

我们通过 IFA 和 WB 对 20 株 mAbs 的生物学特性进行研究，结果表明，除了 12-3B2G5、17-5C11E3、Q3-1C9F6、16-5E7E8、8-2B4A3、15-4B9H10、5-1C8B6 之外，另外 13 株 mAbs 都识别了 ASFV（图 3-2，表 3-1）。通过 WB 的验证结果发现 Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 不与 ASFV 反应，

而 1-1D2B3、5-1C8B6、8-2B4A3 和 15-4B9H10 对 ASFV 的反应性较低（图 3-3，表 3-1）。接着本实验通过 WB 进一步验证了这些单克隆抗体与 p30 蛋白的反应性，除 Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 外，其他单克隆抗体均与 p30 蛋白反应（图 3-4，表 3-1），结果同上述 mAbs 与 ASFV 反应一致。上述结果表明，Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 识别构象依赖性表位。

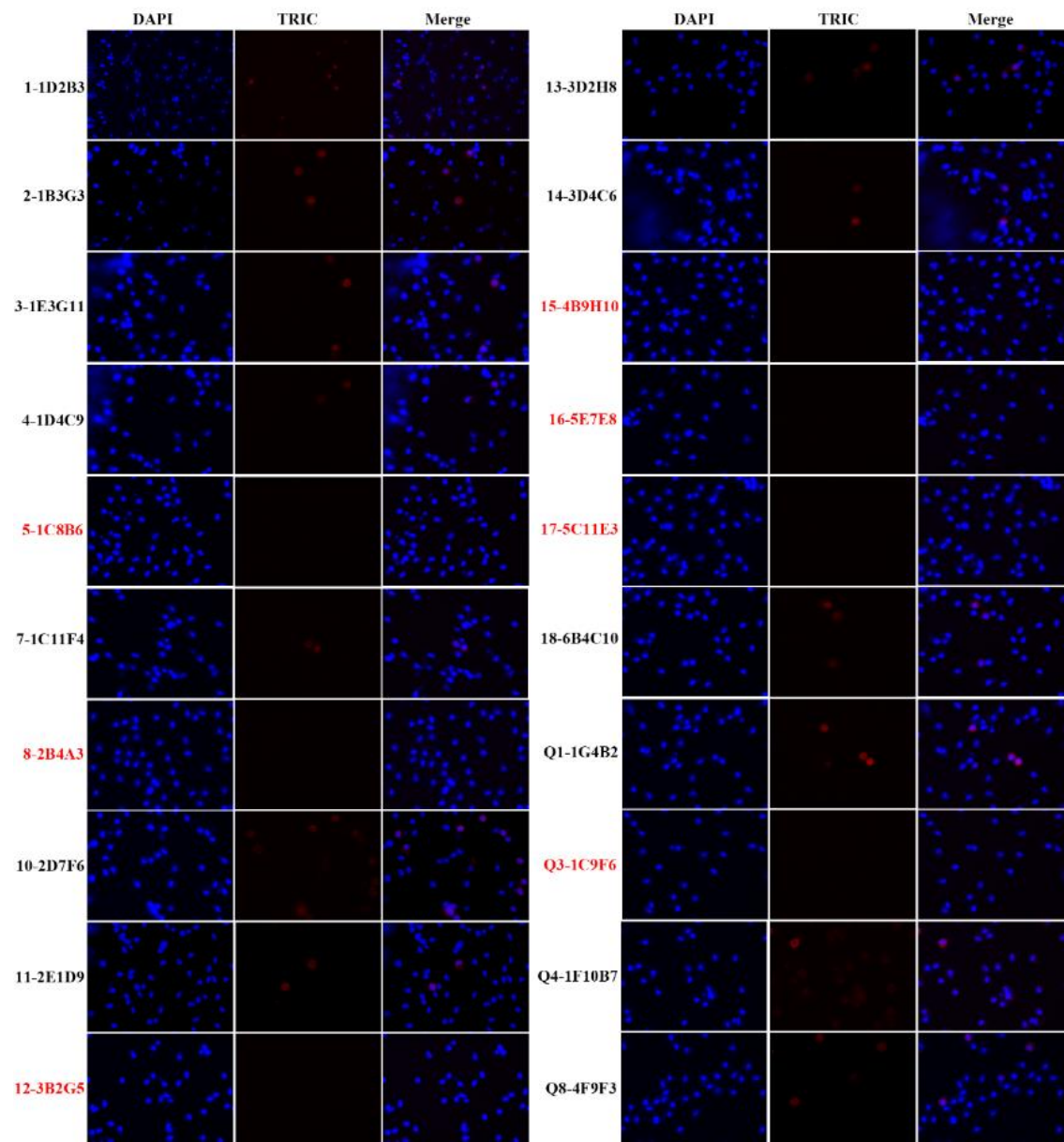


图 3-2 用间接免疫荧光法(IFA)鉴定 20 株单抗

Figure 3-2 Identification of 20 mAbs by indirect immunofluorescence assay (IFA)

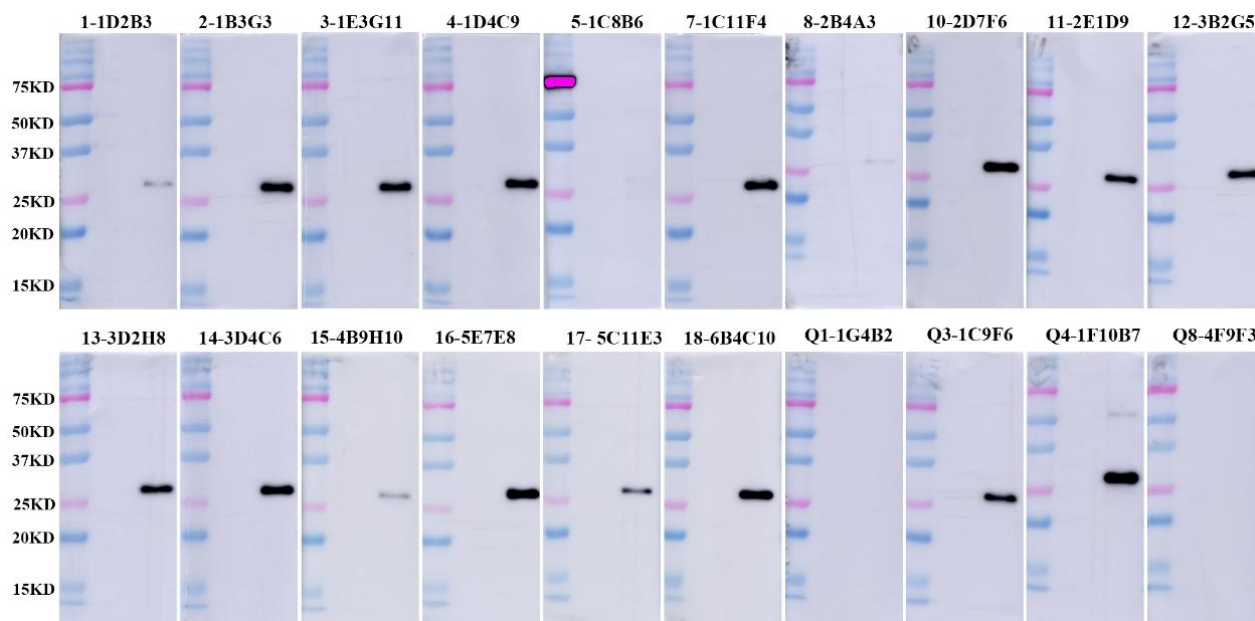


图 3-3 WB 鉴定 20 株 mAbs 与 ASFV 的反应性

Figure 3-3 Reacticity of 20 mAbs against ASFV was identified by WB

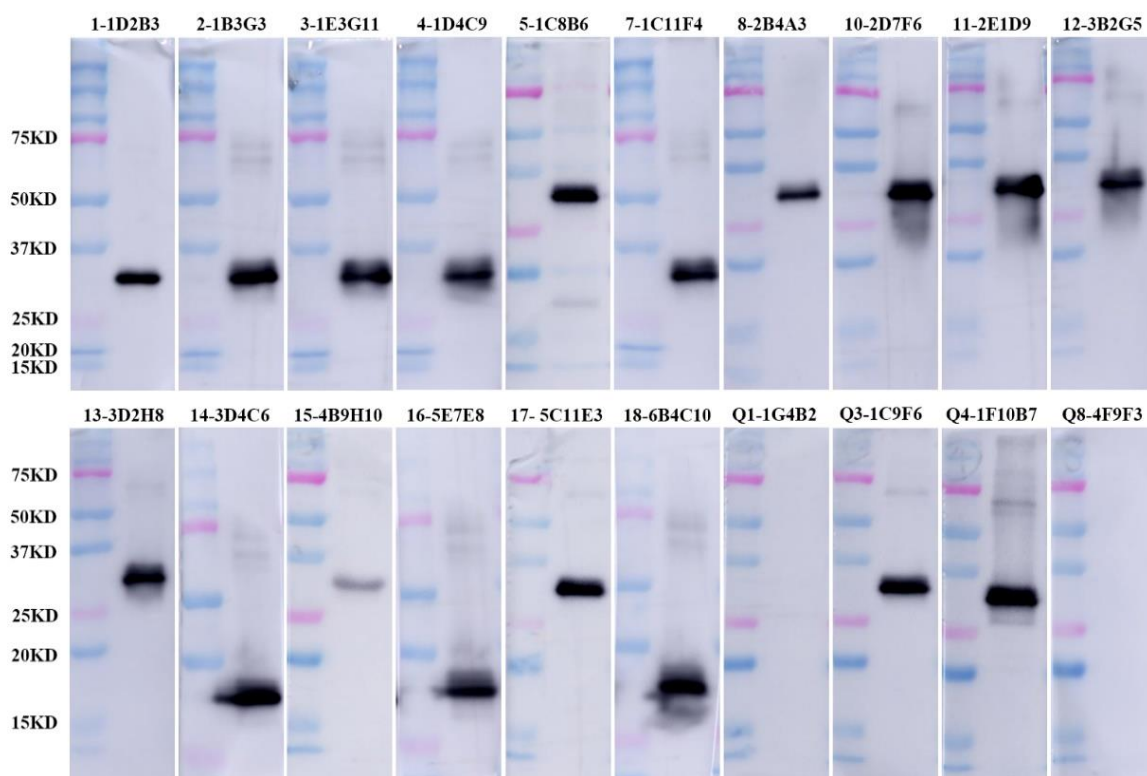


图 3-4 用 Wb 鉴定 20 株单抗对 p30 蛋白的反应性

Figure 3-4 Reacticity of 20 mAbs against p30 protein was identified by WB

3.3.2 化学发光相加法分类 mAbs

通过化学发光相加法来估计 mAbs 的种类需要将 mAb 与抗原反应达到饱和。因此，通过间接 CLIA 确定了每种 mAb 对抗原的饱和曲线。结果如图 3-5 所示，当每种杂交瘤上清液达到的最大 CL 值没有显著变化时，这表明与抗原的反应确实达到了饱和，从而确定了化学发光相加法中每种杂交瘤上清液的稀释度。接着，进行了化学发光相加法，根据实验结果这 20 株 mAbs 可分为 9 组（组 I~IX），如图 3-6，表 3-1 所示。

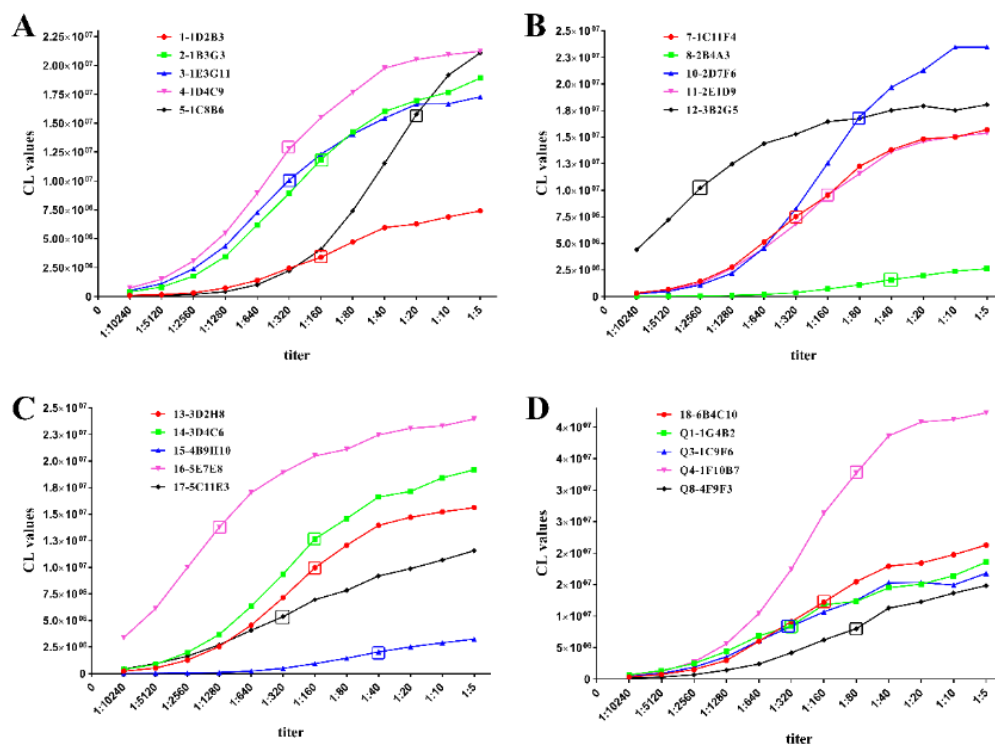


图 3-5 各单抗对 p30 抗原(0.125µg/ml，每孔 100µL)饱和曲线的测定

注：红色方块是在 CLIA 可加性试验中选择的单抗饱和稀释度

Fig 3-5 The determination of the saturation curves of the p30 antigen (0.125 µg/ml in a 100 µl/well) by each Mab

Note: The red square is the mAbs saturation dilution, which was chosen in CLIA additivity test

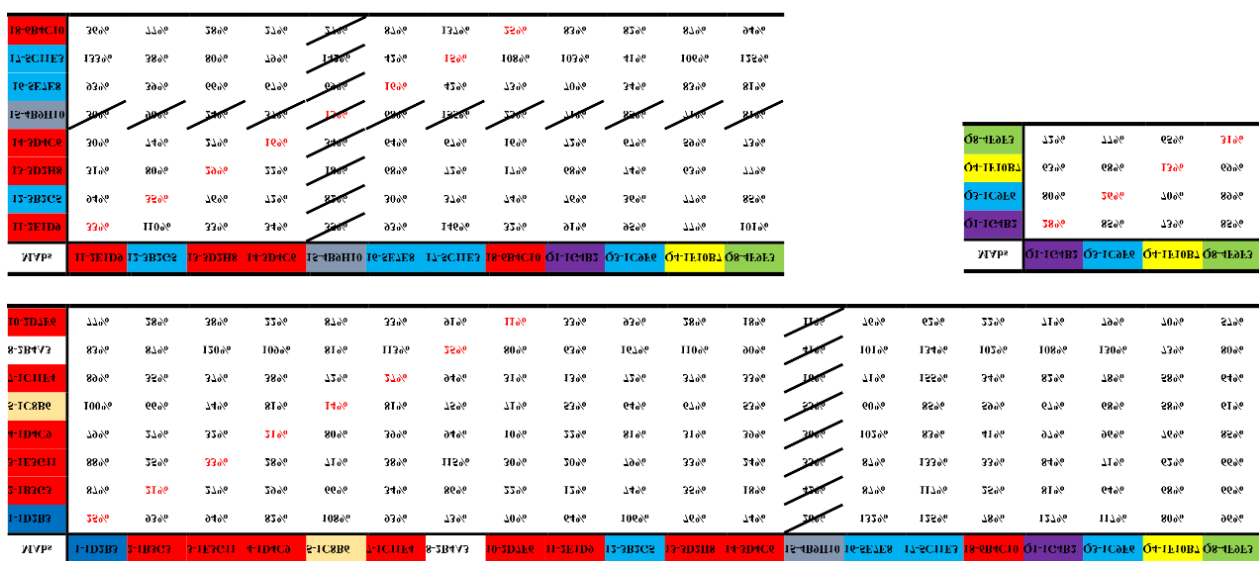


图 3-6 20 株单抗的相加性指数(AI)

注：对于每一对单抗，当 AI 大于 50%时，两种单抗识别的表位不同；当 AI 低于 50%时，这对单抗识别同一表位

Figure 3-6 Additivity index (AI) for 20 Mabs

Note:For each pair of mAbs,the AI higher than 50% was consider as the distinct epitopes recognized by the pair of mAbs.The same epitope was recognized by the pair of mAbs,when AI is lower than 50%

表 3-1 20 株单抗的反应性及基于化学发光相加法的分类

Table 3-1 Reacticity of 20 mAbs and the classification based on CLIA additivity

mAbs	Subgroups	test		
		IFA	WB	
			The reaction with P30 protein	The reaction with ASFV
2-1B3G3	Group I	+	+	+
3-1E3G11	Group I	+	+	+
4-1D4C9	Group I	+	+	+
10-2D7F6	Group I	+	+	+
13-3D2H8	Group I	+	+	+
14-3D4C6	Group I	+	+	+
18-6B4C10	Group I	+	+	+
7-1C11F4	Group I	+	+	+
11-2E1D9	Group I	+	+	+
12-3B2G5	Group II	-	+	+
17-5C11E3	Group II	-	+	+
Q3-1C9F6	Group II	-	+	+
16-5E7E8	Group II	-	+	+
1-1D2B3	Group III	+	+	±
8-2B4A3	Group IV	-	+	±
15-4B9H10	Group V	-	+	±
Q4-1F10B7	Group VI	+	+	+
5-1C8B6	Group VII	-	+	±
Q1-1G4B2	Group VIII	+	-	-
Q8-4F9F3	Group IX	+	-	-

缩略词：“+” 高反应性，“±” 低反应性，“-” 无反应性

Abbreviations: “+” reactivity, “±” low reactivity, “-” non- reactivity

3.3.3 表位的表达与鉴定

我们通过 WB 验证单抗与 p30 的 5 个重叠肽段的反应性，从而确定单抗识别的表位。结果表明，只有 16-5E7E8 与 p30-E（146aa~194aa）有反应，Q4-1F10B7 与 p30-C（84aa~125aa）和 p30-D（116aa~160aa）有反应。因此，Q4-1F10B7 识别的表位是“¹¹⁶TSSFETLFEQ¹²⁵”（图 3-7A）。为了进一步确定单克隆抗体识别的表位，我们验证和分析了 5 个超长重叠肽片段（p30-15、p30-26、p30-37、p30-48、p30-58）与 20 株 mAbs 反应的反应性。结果表明，除了 5-1C8B6、Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 外，所有单克隆抗体都与 p30-48 和 p30-58 有反应（图 3-7B）。随后，笔者利用丙氨酸突变对其余的 16 株单抗进行分类，。根据上述实验得出结果，结合化学发光相加法结果将 I 组分为 I-1 组（2-1B3G3、3-1E3G11、4-1D4C9、10-2D7F6、13-3D2H8、14-3D4C6 和 18-6B4C10）和 I-2 组（7-1C11F4、11-2E1D9），将 II 组分为 II-1 组（12-3B2G5、17-5C11E3 和 Q3-1C9F6）和 II-2 组（16-5E7E8）（图 3-7C）。

为了确定这些单抗识别的最小表位并精确定位表位中的关键氨基酸，表达了一组连续 4 个丙氨酸突变的蛋白以及 N 端和 C 端截短的肽段，并通过 WB 进行分析。最终确定了每组代表性单克隆抗体识别的关键氨基酸和最小表位（图 3-7D，表 3-2）。组 II-2 识别的最小表位是 154~190aa，I-1、I-2、II-1、III、IV 和 V 组识别的最小表位是 137~194aa。I-1 组和 I-2 组，以及 II-1 组和 II-2 组识别的关键氨基酸相似，因此，在化学发光相加法中，加入另一种 mAb 并不会增加 CL 值（AI<50%）。

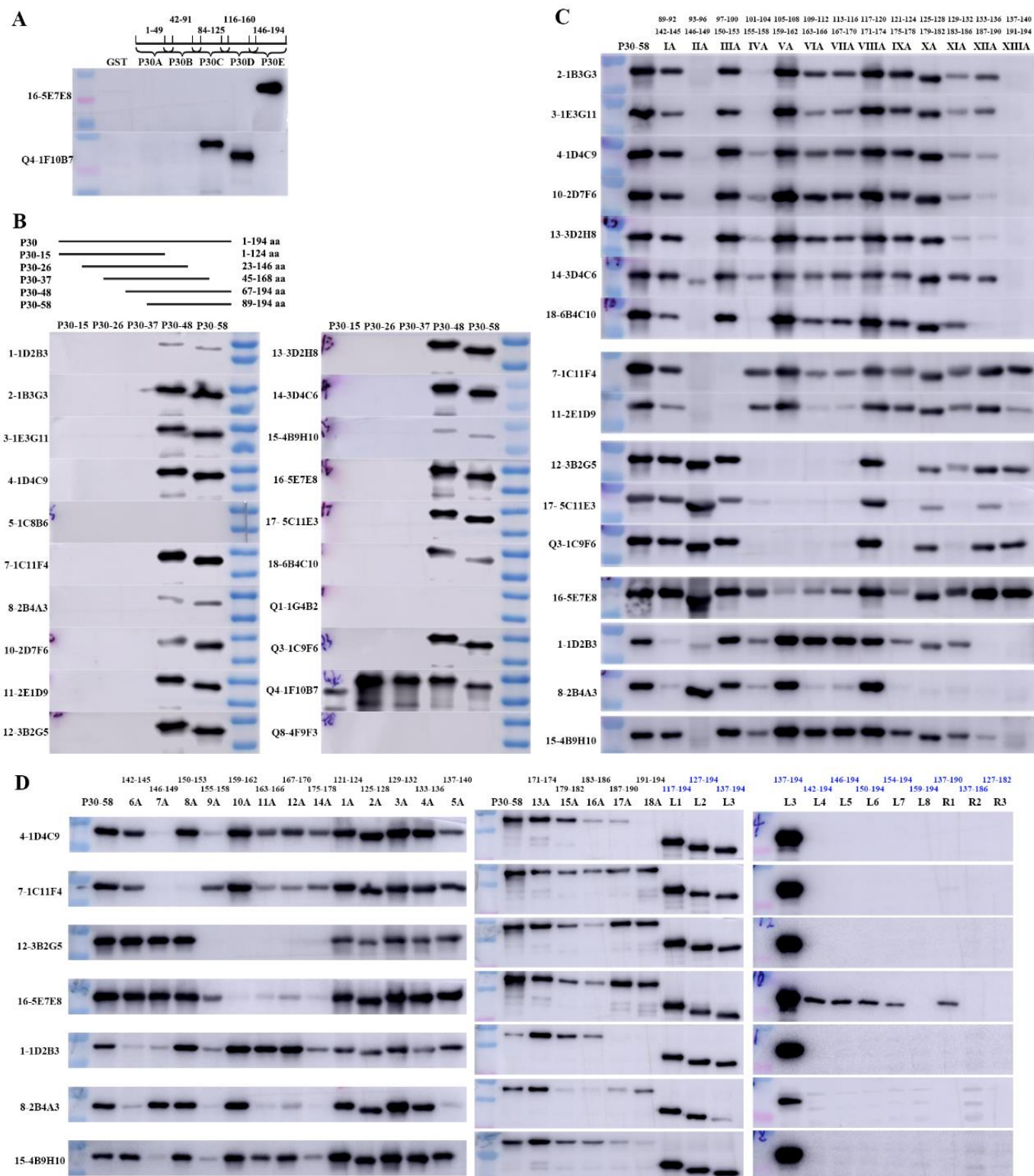


图 3-7 20 种单克隆抗体识别表位的作图分析

A: 5 个重叠多肽的 WB 分析图 (p30-a-p30-e); B: WB 鉴定 5 个超长重叠多肽 (p30-15、p30-26、p30-37、p30-48 和 p30-58) 与 20 种克隆抗体的反应性; C: 16 株单克隆抗体与八个丙氨酸突变的重组蛋白 (IA~XIIIA) 反应性, IA~XIIIA 顶

部的数字代表每个重组蛋白中丙氨酸突变的位置；D： 7 株单克隆抗体和连续 4 个丙氨酸突变蛋白质（1A~18A）的反应性及 N 端（L1~L8）和 C 端（R1~R3）截短肽的反应性。1A~18A 顶部的数字代表每个蛋白质中丙氨酸突变的位置， L1~L8 和 R1~R3（蓝色字体）顶部的数字代表截短肽的氨基酸长度

Figure 3-7 Mapping analysis of epitopes recognized by 20 monoclonal antibodies

A: WB analysis graph of five overlapping peptides (p30-a to p30-e); B: WB identification of the reactivity between five ultra-long overlapping peptides (p30-15, p30-26, p30-37, p30-48, and p30-58) and 20 monoclonal antibodies; C:

A series of eight alanine-mutated recombinant proteins (IA~XIIIA) were analyzed with 16 monoclonal antibodies. The numbers at the top of IA~XIIIA represent the location of alanine mutation in each recombinant protein; D: Seven monoclonal antibodies were used to analyze four consecutive alanine-mutated proteins (1A~18A) as well as N-terminal (L1~L8) and C-terminal truncated peptides (R1~R3). The numbers at the top of 1A~18A represent the location of alanine mutation in each protein, while the numbers at the top of L1~L8 and R1~R3 (in blue font) indicate the length of amino acids in the truncated peptides

表 3-2：20 株单克隆抗体识别的最小表位和这些表位中的关键氨基酸

Table 3-2: Profile of the minimal epitopes of 20 mAbs and determination of critical residues in these epitopes

Subgroup ^a	Epitopes ^b	Location	mAbs
Group I-1	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	2-1B3G3, 3-1E3G11, 4-1D4C9, 10-2D7F6, 13-3D2H8, 14-3D4C6, 18-6B4C10
Group I-2	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	7-1C11F4, 11-2E1D9
Group II-1	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	12-3B2G5, 17-5C11E3 and Q3-1C9F6
Group II-2	APDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKL	154aa~190aa	16-5E7E8
Group III	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	1-1D2B3
Group IV	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	8-2B4A3
Group V	LYMLAQKTVQHIEQYGGKAPDFNKVIRAHNFIQTITGTPLEKEEKEVVRLMVIKLLKKK	137aa~194aa	15-4B9H10
Group VI	TSSFETLFEQ	116aa~125aa	Q4-1F10B7
Group VII	Unidentified		5-1C8B6
Group VIII	Unidentified		Q1-1G4B2
Group IX	Unidentified		Q8-4F9F3

注：^a根据 WB 和化学发光相加法相加法将 20 株单抗分为 11 组；

^b表位中红色、蓝色和绿色代表氨基酸关键程度逐渐降低，即标记为红色的氨基酸表示如果表位中的氨基酸发生突变，则表位将不会与相应的单抗发生反应；标记为蓝色的氨基酸表示当这些残基被 ALA 取代时，这些表位与抗体的反应会显著降低；标记为绿色的氨基酸表示当发生突变时与抗体的反应略降低

Note: ^a20 mAbs were classified into 11 groups basing on WB and CLIA additivity test.

^bThe color red, blue, and green in the epitopes represent gradually reduction of the critical degree of the amino acid, namely the amino acid labeled red denoted that the epitope would not react with corresponding mAbs if the amino acid in the epitope was mutated, and the amino acid labeled blue denoted that the reactions between these epitope and antibodies

were significantly decreased when these residues were replaced by Ala, and the amino acid labeled green denoted that the reactions

3.3.4 不同 ASFV 分离株中表位的保守性

验证了 11 组单克隆抗体识别的表位在不同 ASFV 分离株中的保守性。序列比对发现，仅在第 VI 组识别的表位中存在 1 个氨基酸变异（Thr¹¹⁶ 变为 Ala¹¹⁶）。第 I-1 组、第 I-2 组、第 II-1 组、第 II-2 组、第 III 组和第 V 所识别的表位相对保守。仅在某些 ASFV 分离株中存在 Met¹³⁹、Thr¹⁴⁴、Tyr¹⁷¹、Thr¹⁷³ 和 Val¹⁸² 的突变，但这些突变并非关键性突变，不会严重影响与单抗的反应（图 3-8）。

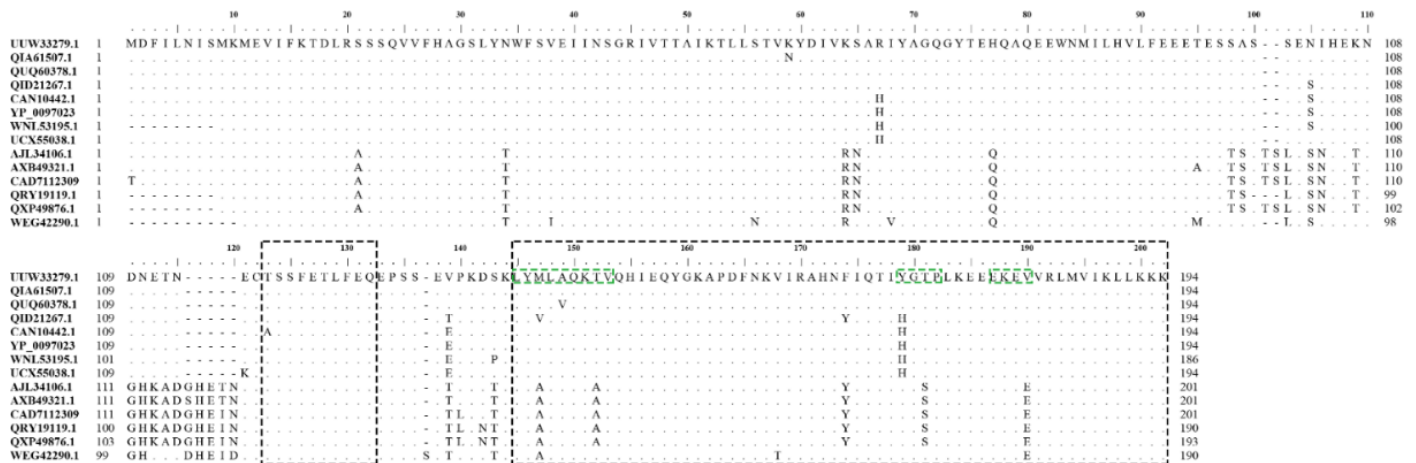


图 3-8 17 个 ASFV p30 代表性序列的比对

Figure 3-8 Sequence alignment of 17 ASFV p30 representative sequences

3.4 讨论

表位鉴定有助于研究人员更好地了解抗原结构及病毒与抗体相互作用。它也为亚单位疫苗的设计和诊断方法的开发提供了重要信息^[113,114]。在本研究中，获得了 20 株针对 ASFV p30 抗原的 mAbs。通过使用 5 个短重叠肽、5 个超长重叠肽片段、一系列连续的丙氨酸突变对这些 mAbs 识别表位进行鉴定，结合化学发光相加法将这 20 种 mAbs 分为 11 组。

其中 6 组 mAbs（组 I-1、I-2、II-1、III、IV 和 V，共 15 株 mAbs）识别的表位在 137~194aa，而组 II-2 中 mAb（16-5E7E8）识别的表位在

154~190aa, 但每组 mAb 识别表位中关键氨基酸不同。其中, 组 I-1 和 I-2, 以及组 II-1 和 II-2 识别表位中的某些关键氨基酸相似。上述 7 组 mAbs 识别的表位均超过 15aa, 但能够在 WB 中以变性形式反应, 这可能与 p30 C 末端的结构有关。某些表位上的 137~145aa 不是关键氨基酸, 但这些氨基酸的缺失导致相应的单抗不会与其发生反应, 这表明这些氨基酸对维持 p30 C 末端的结构具有重要作用。上述 mAbs 识别的这些表位与 Petrovan 等^[115]报道的 mAbs 62-35 和 142-4 以及 Wu 等^[114]报道的其余 7 个 mAbs 相似。Petrovan 等^[115]使用 GeneSilico MetaDisorder 预测了一个包含 91~143aa 肽段序列的区域是无序或灵活的, 并认为该区域与在 Western blot 变性条件下的 mAbs 反应性有关。显性表位区域对于亚单位疫苗中表位的选择和诊断方法灵敏度的提高非常重要。结果表明, 该表位区域相对保守, 仅在一些 ASFV 分离株之间发生少数突变, 且这些突变不是关键的氨基酸。这些特性可能为基于此类 mAbs 或表位区域的诊断方法提供更广泛的诊断覆盖范围。组 VI 单抗 Q4-1F10B7 识别的“¹¹⁶TSSFETLFEQ¹²⁵”是线性表位, 与 Wu 等^[114]之前报道的相同。组 VII 单抗 5-1C8B6、组 VIII 单抗 Q1-1G4B2 和组 IX 单抗 Q8-4F9F3 识别的表位可能是构象表位。

3.5 本章小结

- (1) 结合 WB 与化学发光相加法将 20 株 mAbs 分成 11 组。
- (2) 基于 p30 基因片段设计并表达了一系列 p30 重叠肽和丙氨酸突变蛋白, 通过 WB 确定单抗识别的抗原表位。结果表明组 I-1、I-2、II-1、III、IV 和 V 中单抗识别的最小表位为 137aa~194aa, 组 II-2 中单抗识别的最小表位为 154aa~190aa, 单抗 Q4-1F10B7 识别表位 ¹¹⁶TSSFETLFEQ¹²⁵ 是线性表位, 单抗 5-1C8B6、Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 识别的表位可能是构象表位。
- (3) 序列比对发现仅在第 VI 组识别的表位中存在 1 个氨基酸变异 (Thr¹¹⁶ 变为 Ala¹¹⁶)。第 I-1 组、第 I-2 组、第 II-1 组、第 II-2 组、第 III 组和第 V 中单抗所识别的表位相对保守。

第四章 检测 ASFV p30 抗体竞争化学发光法 p30-cCLIA 的建立

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）感染引起猪的一种急性、热性、高度接触性和致死性动物疫病，给全球的生猪及其相关产业造成了巨大的经济损失。由于目前尚无商品化的疫苗，而近年来 ASFV 的不断进化，出现中等毒力基因 II 型毒株，以及基因 I 型弱毒株的传入，使发病猪出现持续性和慢性感染，因此特异性抗体检测对于 ASFV 的诊断至关重要。在本研究中我们建立了一种检测 ASFV p30 抗体的竞争化学发光法（p30-cCLIA）。并通过检测背景清楚的阴阳性血清确定了该方法的 Cut-off 值为 50%，诊断敏感性（Dsn）为 100%，诊断特异性（Dsp）为 100%。在灵敏度评价中，该方法比商品化 ELISA 试剂盒灵敏度更高。使用 p30-cCLIA 与商品化 ELISA 试剂盒检测感染后的猪血清及临床阴性猪血清，结果显示该方法与商品化试剂盒准确率一致。

4.1 材料

4.1.1 实验试剂

化学发光板购于（Thermo Fisher 公司），血清稀释液（济南百迪泰），碳酸盐缓冲液购于（北京索莱宝），化学发光液（北京科跃中楷生物技术有限公司），脱脂奶粉购于（BD-Pharmingen 公司），非洲猪瘟阻断试剂盒（青岛立行见远生物科技有限公司）。

4.1.2 实验仪器

化学发光仪、细胞恒温培养箱（Thermo Fisher，美国），蛋白纯化仪（GE AKTA pure，美国）。

4.1.3 血清样本

ASF 标准阳性血清：购于北京兽医药品监察所。

ASF 标准阴性血清（P734）：来自本实验室在非洲猪瘟疫情暴发前采集的猪血清。

已知背景清楚的血清：来自本实验室保存从我国两个养猪场（甘肃天水秦安和庄浪）采集的 445 份阴性猪血清，用于确定 p30-cCLIA 的 Cut-off 值和诊断特异性；27 份阳性血清来自田间感染的猪，用于确定 p30-cCLIA 的 Cut-off 值和诊断敏感性；七种猪病毒（猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、猪圆环病毒 2 型（PCV2）、猪细小病毒（PPV）、猪瘟病毒（CSFV）、猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）、口蹄疫病毒（FMDV）、猪流行性腹泻病毒（PEDV））阳性血清由本实验室保存并提供。

4.2 实验方法

4.2.1 p30-cCLIA 的建立

4.2.1.1 p30-cCLIA 检测条件优化

根据上述实验，笔者选取与 ASFV 抗原反应性好且与 ASFV 阳性血清具有良好竞争能力的 mAb（16-5E7E8）送去金斯瑞生物科技有限公司标记 HRP，将其作为酶标单抗用于后续试验。

（1）使用 CBS 将 p30 重组蛋白稀释至终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.125 $\mu\text{g/mL}$ ，按 100 μL /孔加入 96 孔化学发光板中，置于 4℃冰箱过夜包被；

（2）弃液拍干；

（3）使用加有 6%马血清的酶标板封闭液进行封闭，按每孔 220 μL 加入包被有 p30 的化学发光板中，将其置于 37℃恒温培养箱封闭 2 h；

（4）准备不同稀释度的 ASF 标准阴阳性血清和酶标单抗 16-5E7E8-HRP。将血清稀释至 1:2.5、1:5、1:10、1:20，将酶标单抗稀释至 1:25000、1:50000、1:100000；

（5）将封闭后的化学发光板取出，弃掉封闭液，1×PBST 洗 3 次，拍干；

（6）在每个孔中同时加入相应稀释度的血清和酶标单抗各 50 μL ，将化学发光板置于 37℃恒温培养箱中反应 30 min；

（7）弃掉反应后的液体，使用 1×PBST 洗涤化学发光板 5 次，拍干；

（8）将恢复至室温的化学发光 A 液和 B 液按 1:1 的比例混合，每孔加入

100 μL 混合后的化学发光液, 37°C恒温培养箱中反应 5 min;

(9) 使用化学发光仪测量化学发光值, 做好记录并进行数据分析。

4.2.1.2 p30-cCLIA 反应时间的优化

通过 4.2.1.1 的实验, 确定最佳抗原包被浓度、酶标单抗稀释度和血清稀释度后, 对反应时间进行优化。

(1) 使用 CBS 将 p30 重组蛋白稀释至最终浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 按 100 μL /孔加入 96 孔化学发光板中, 置于 4°C冰箱过夜包被;

(2) 弃液拍干;

(3) 每孔加入 220 μL 加有 6%马血清的酶标板封闭液, 37°C封闭 2 h;

(4) 弃液, 1×PBST 洗 3 次, 拍干;

(5) 将 ASF 标准阴阳性血清 1:5 稀释后加入到包被 p30 的化学发光板, 50 μL /孔, 然后立即加入 50 μL 1:50000 稀释的酶标单抗 16-5E7E8-HRP。每板设置三个重复孔;

(6) 将化学发光板置于 37°C条件下, 分别进行 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 的反应, 在每个时间点, 取出相应的孔板进行检测;

(7) 弃液, 1×PBST 洗 3 次, 拍干;

(8) 每孔加入 100 μL 化学发光液, 37°C反应 5 min;

(9) 使用化学发光仪测化学发光值。

4.2.2 抗体稳定剂加速实验

为了筛选并获得适合保存单抗 16-5E7E8-HRP 的酶标抗体稳定剂, 笔者分别用 M1、M3、M5、M 和 MZ 5 种酶标抗体稳定剂将酶标单抗 16-5E7E8-HRP 按照 1:50000 稀释, 置于 37°C进行加速实验, 即保存 0, 1, 3, 7 和 15 d 时用来检测标准阳性血清 (P3352)、标准阴性血清 (P734); 结果用 PI ((1-阳性对照平均 CLIA 值/阴性对照平均 CLIA 值) × 100%) 来评价。

4.2.3 p30-cCLIA 检测血清样本

将 p30 重组蛋白用 CBS 稀释为终浓度 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 4°C过夜包被。用加有 6% 马血清的酶标板封闭液进行封闭, 37°C封闭 2 h, 拍干后抽真空, 放于 4°C保存

备用。使用上述优化的最佳检测条件检测 ASF 阴性血清（445 份）和 ASF 阳性血清（27 份）。具体操作为：

- （1）从冷库中取出包被好 p30 的化学发光板，将其平衡至室温；
- （2）在 U 型稀释板上，按 1:5 的比例稀释待检血清和标准阴阳性血清；然后，在 U 型槽中，将酶标单抗 16-5E7E8-HRP 按 1:50000 的比例稀释；
- （3）然后将稀释好的血清按 50 μ L/孔从 U 型稀释板中转移到之前取出的化学发光板上；
- （4）然后每孔迅速加入 50 μ L 稀释好的酶标单抗 16-5E7E8-HRP；
- （5）将加样后的化学发光板放入 37℃恒温箱中，孵育 30 min；
- （6）弃液，1×PBST 洗 5 次，拍干；
- （7）每孔加入 100 μ L 化学发光液，37℃反应 5 min；
- （8）使用化学发光仪测化学发光值。

4.2.4 Cut-off 值、诊断敏感性（Dsn）、诊断特异性（Dsp）的确定

通过检测上述背景清楚的 ASF 阳性和阴性血清，计算阻断率（PI）。然后使用 MedCalc 软件作 ROC 曲线和背景交互点图，来确定 Cut-off 值、Dsp 和 Dsn。

当标准阴性血清的化学发光值 $\geq 10,000,000$ ，标准阳性血清的阻断率（PI） $\geq 95\%$ 时，表示检测结果有效。

4.2.5 p30-cCLIA 与商品化试剂盒检测性能对比

使用 p30-cCLIA 和商品化阻断试剂盒分别检测 27 份感染后猪血清和 66 份临床健康的猪血清，比较这两种检测方法的准确性和符合率。

4.2.6 p30-cCLIA 灵敏度、重复性、交叉反应性实验

将 ASFV 标准阳性血清按 1:2~1:4096 连续 2 倍稀释，然后用 p30-cCLIA 和商品化阻断试剂盒进行检测，灵敏度为 PI 值超过 Cut-off 值时血清的最高稀释度。

为了计算批次内和批次间的重复性性能，使用相同和不同批次 p30 包被的化学发光板在不同的时间里对六份具有不同 PI 值的血清样品进行检测，评估其重复性。

用已建立的 p30 抗体化学发光法分别对 7 种其他七种猪病毒（PCV2、PPV、FMDV、PRRSV、PDCoV、CSFV、PEDV）的阳性血清进行检测，以分析是否存在交叉反应。

4.3 结果

4.3.1 p30-cCLIA 的最佳检测条件

结合棋盘滴定法的结果和信噪比，确定了最佳反应条件为：最佳抗原包被浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，最佳血清稀释度为 1:10，最佳酶标单抗浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ （图 4-1）。

然后对 p30-cCLIA 反应时间进行了优化，确定了最佳反应时间为 30 min（图 4-2）。在这些最佳反应条件下，阻断率可达 99.5%。

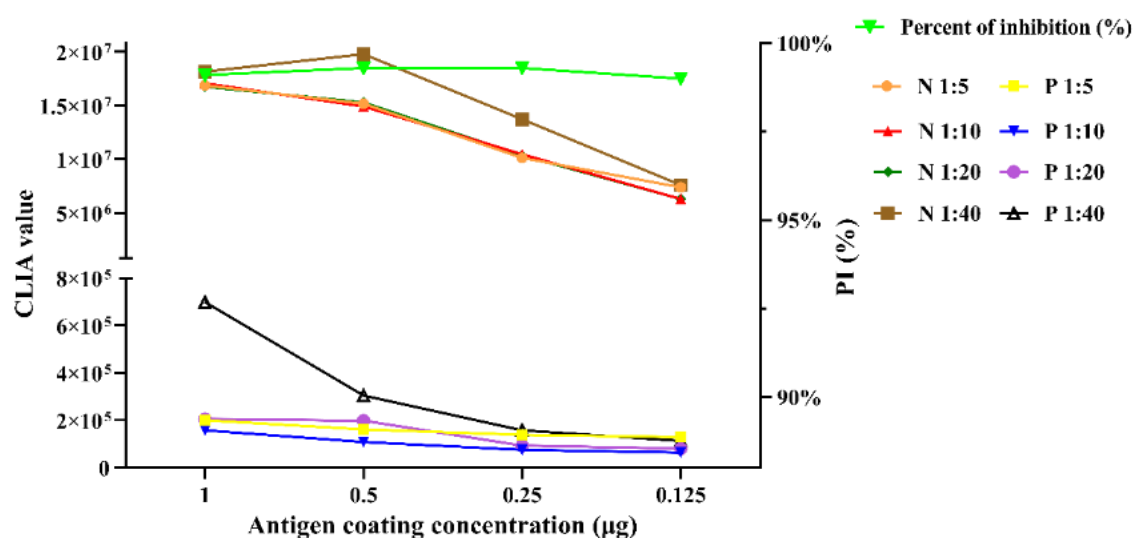


图 4-1 棋盘滴定法优化抗原包被浓度和血清稀释度

Figure 4-1 Optimization of antigen coating concentration and serum dilution by chessboard titration

N: 阴性血清样本; P: 阳性血清样本

N:Negative serum samples; P:Positive serum sample

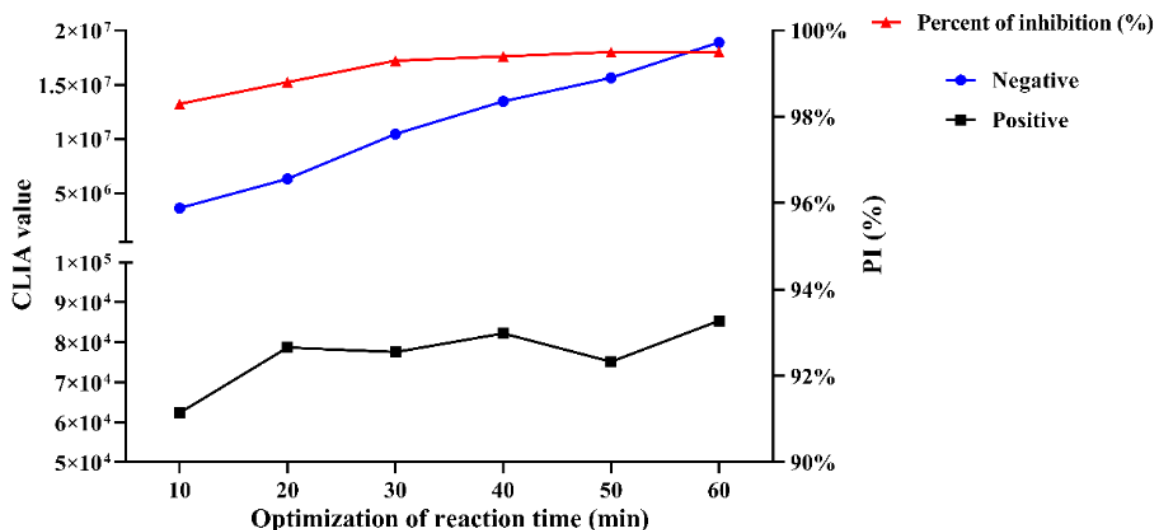


图 4-2 反应时间的优化

Figure 4-2 Optimization of reaction time

4.3.2 酶标抗体稳定剂的筛选

5 种酶标抗体稳定剂加速试验结果表明，保存酶标抗体 16-5E7E8-HRP 的最适酶标抗体稳定剂为 M1 和 M5，根据经济因素和信噪比，我们最终确定将 M5 用于保存 16-5E7E8-HRP 的酶标抗体稳定剂（图 4-3）。

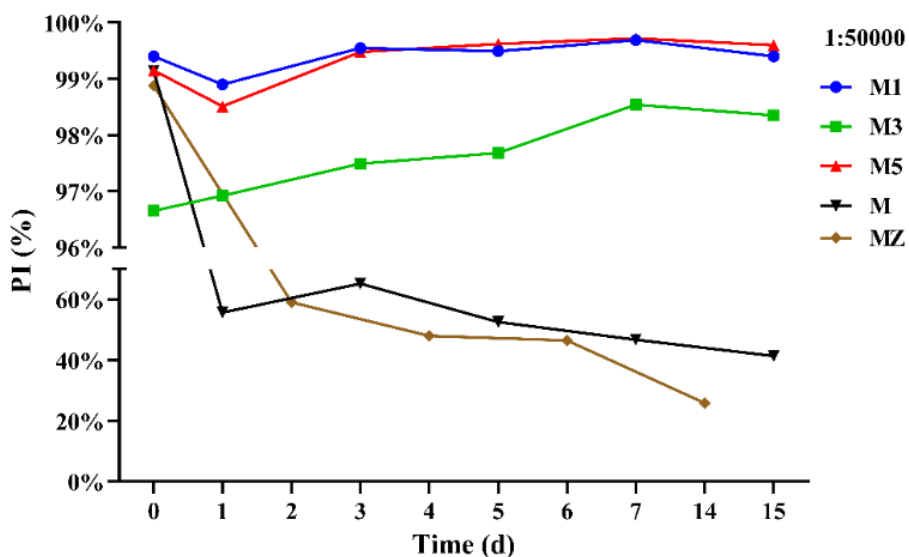


图 4-3 酶标抗体稳定剂的筛选

Figure 4-3 The stabilizers of enzyme-labeled antibody were screened

4.3.3 p30-cCLIA 的 Cut off 值、Dsn、Dsp

使用上述优化的最佳检测条件检测已知背景清楚的 445 份阴性猪血清和 27 份阳性猪血清，作 ROC 曲线图（图 4-4-A）和背景交互点图（图 4-4-B），结果表明，当 Cut off 值为 50% 时，Dsn 为 100%，Dsp 为 100%。

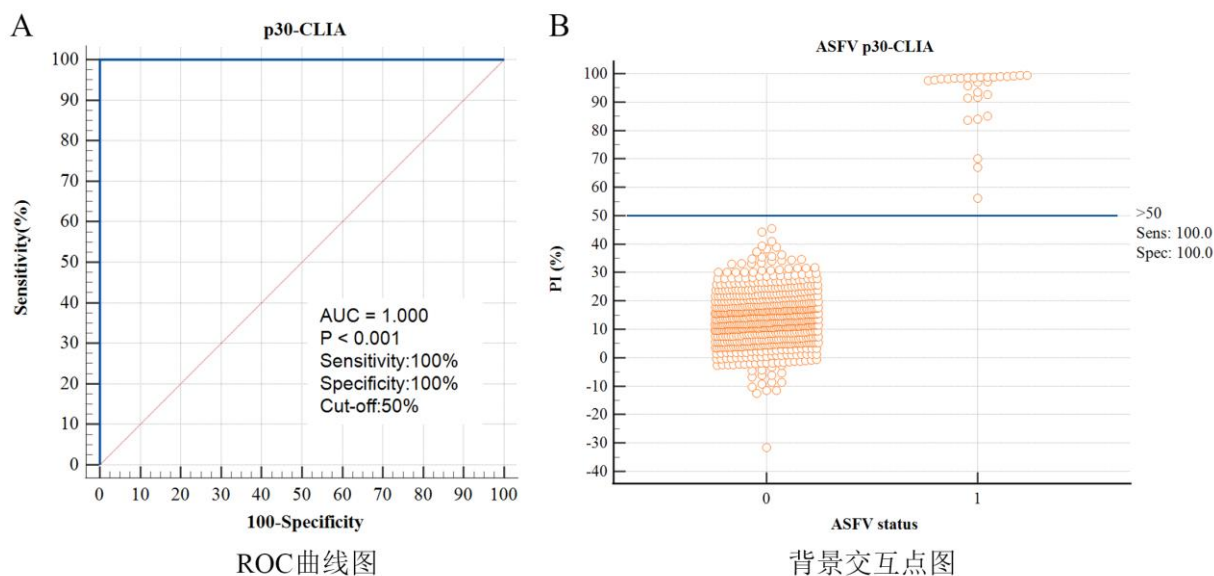


图 4-4 p30-cCLIA Cut-off 值的确定

Figure 4-4 Determination of the Cut-off value for the p30-cCLIA

A: ROC 曲线图，图上的每个点代表特定阈值下的 Dsn 和 Dsp；B: 背景交互点图，0 为阴性血清样本，1 为阳性血清样本

A: ROC curve, with each point on the graph representing the Dsn and Dsp at a specific threshold; B: Background cross-point plot, 0 represents a negative serum sample and 1 represents a positive serum sample

4.3.4 p30-cCLIA 和商品化检测试剂盒检测性能对比

通过检测背景清楚的血清样本来评估 p30-cCLIA 和商品化阻断试剂盒的检测性能。结果如表 4-1 所示：p30-cCLIA 检测准确性与商品化诊断试剂盒结果一致，说明 p30-cCLIA 的符合率达到要求。

表 4-1 p30-cCLIA 与商品化试剂盒符合率对比

Table 4-1 Comparison of coincidence rates of p30-cCLIA and commercial kit

样本来源	样本数量	p30-cCLIA			立行见远阻断试剂盒		
		阳性样本	阴性样本	准确率	阳性样本	阴性样本	准确率
感染阳性猪血清	27	27	0	100%	27	0	100%
阴性猪血清	66	0	66	100%	0	66	100%

4.3.5 p30-cCLIA 灵敏度实验

通过 2 倍连续稀释标准阳性猪血清样品测定 p30-cCLIA 的灵敏度，并与商品化阻断试剂盒进行比较（图 4-5）。结果表明，p30-cCLIA 的灵敏度为 1:2048，商品化阻断试剂盒的灵敏度为 1:512，表明 p30-cCLIA 比商品化试剂盒的灵敏度更高。

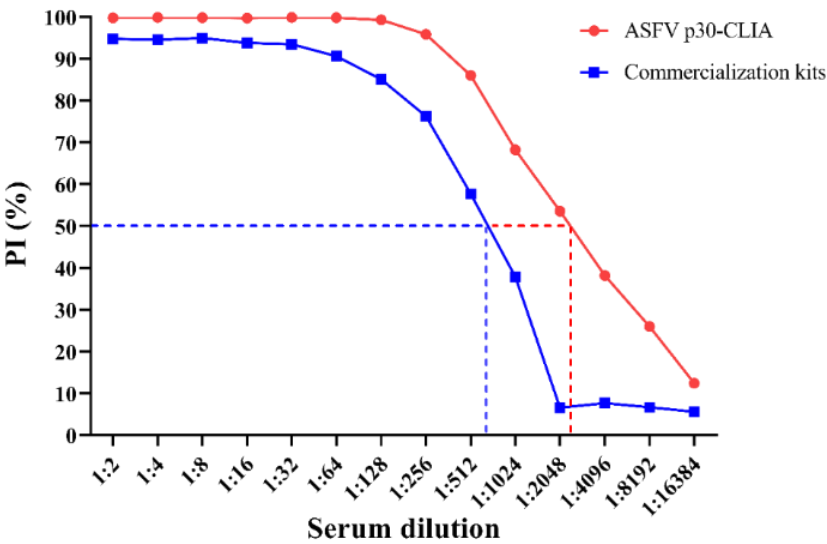


图 4-5 p30-cCLIA 与商品化试剂盒灵敏度比对

Figure 4-5 Comparison of sensitivity between p30-cCLIA and commercial kit

4.3.6 p30-cCLIA 重复性实验

用 6 组血清的 PI 值计算 p30-cCLIA 的重复性（表 4-2），p30-cCLIA 的批内

变异系数为 0.1%~14.8%，批间变异系数为 0.1%~18.7%，表明该方法具有良好的重复性。

表 4-2 p30-cCLIA 的批内重复性和批间重复性

Table 4-2 Repetitiveness of intra-batch and inter-batch

血清	批间			批内		
	平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)	平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)
1	17.21	3.22	18.7	12.00	0.59	4.9
2	21.21	2.93	13.8	23.12	2.42	10.4
3	25.96	2.20	8.5	23.20	3.19	13.7
4	26.06	4.27	16.4	18.28	2.70	14.8
5	98.73	0.08	0.1	98.79	0.09	0.1
6	99.20	0.06	0.1	99.03	0.18	0.2

4.3.7 p30-cCLIA 特异性实验

为了评估 p30-cCLIA 的特异性，我们检测了七种其他猪病毒（PCV2、PPV、FMDV、PRRSV、PDCoV、CSFV、PEDV）的阳性血清（图 4-6）。结果表明：ASFV 阳性血清的 PI 值约为 99.5%，七种其他病毒阳性血清的 PI 值在 2.2%~29.5% 之间，PI 值明显小于 Cut-off 值，表明新开发的 p30-cCLIA 与这些病毒感染血清无交叉反应。

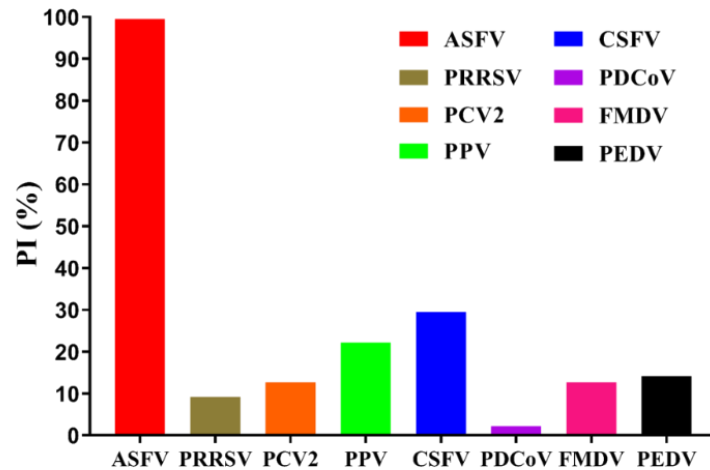


图 4-6 p30-cCLIA 检测 8 种猪病毒血清的 PI 值

Figure 4-6 PI values of eight porcine viruses after p30-cCLIA detection

4.4 讨论

自 2018 年我国首次发生 ASF 以来，严重影响了我我国生猪养殖业的发展^[116]。之后，我国又出现中等毒力基因 II 型毒株和低毒力基因基因 I 型毒株，使得 ASFV 抗体检测势在必行^[39]。因此，建立一种能准确、快速检测 ASFV 抗体的诊断方法对疫情发现和早期防控尤其重要。

目前，已经涌现出多种血清学诊断技术用于检测 ASFV 特异性抗体^[73,74,76,77]。ELISA 是 WOA 推荐用于检测 ASFV 抗体的方法，也是血清学诊断中最常用的检测方法，基于各种抗原蛋白的间接 ELISA 以及基于单抗的竞争性 ELISA 已被广泛建立^[93]。Zhou 等^[117]基于 p30 和 pB602L 蛋白建立了一种用于检测 ASFV 抗体的双抗原间接 ELISA，结果展示了其良好的特异性，检测灵敏度为 1 : 1600。Zhou 等^[118]利用 p30 单抗建立了一种竞争 ELISA，结果显示建立的 cELISA 具有良好的重复性，且不与其他六种猪病的感染血清（CSFV、PEDV、RV、PRV、PRRSV、PCV2）发生交叉反应。本研究基于 p30 单克隆抗体，开发了一种检测 ASFV 抗体的竞争化学发光法（p30-cCLIA）。相较于商品化 INgezim PPA COMPAC ELISA 试剂盒及青岛立行见远阻断 ELISA 试剂盒的检测时间 1 h 30 min，p30-cCLIA 仅需 30 min，大大缩短了检测时间。在检测灵敏度方面，Zhou 等^[117]和 Yu 等^[119]建立检测 ASFV 抗体的 ELISA 检测阳性标准血清的最大稀释度分别为 1 : 1600 和 1 : 512，而本研究建立的 p30-cCLIA 检测灵敏度为 1 : 2048，

表明 p30-cCLIA 具有很好的敏感性。

本研究建立 cut-off 值所用的阳性样品较少，因此通过检测大量背景清楚的阴性血清来确定更准确的 Cut off 值，最终确定了 Cut off 值为 50%，诊断敏感性（Dsn）为 100%，诊断特异性（Dsp）为 100%。

4.5 本章小结

总之，本研究基于 p30 单抗建立了一种检测 ASFV 抗体的竞争化学发光法。该方法展示了良好的敏感性、特异性和重复性，且与商品化试剂盒的符合率一致。与传统的 ELISA 相比，p30-cCLIA 大大缩短了检测时间。因此，p30-cCLIA 可为 ASFV 的早期、快速诊断提供有力工具。

第五章 全文结论

1、成功构建重组质粒 pET-28a-p30，并成功表达及纯化了 p30 重组蛋白。将纯化的 p30 重组蛋白免疫小鼠，最终获得 20 株能稳定分泌 p30 特异性抗体的单克隆抗体。

2、通过 IFA 和 WB 对 20 株单克隆抗体进行生物学特性分析，IFA 结果表明除了 12-3B2G5、17-5C11E3、Q3-1C9F6、16-5E7E8、8-2B4A3、15-4B9H10、5-1C8B6 之外，另外 13 株 mAbs 都与 ASFV 反应；WB 结果表明 Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 不与 ASFV 反应，而 1-1D2B3、5-1C8B6、8-2B4A3 和 15-4B9H10 与 ASFV 的反应性较低。

3、结合 WB 与化学发光相加法将 20 株 mAbs 分成 11 组。基于 p30 基因片段设计并表达了一系列 p30 重叠肽，通过 WB 和丙氨酸突变确定单抗识别的抗原表位。结果表明单抗 Q4-1F10B7 识别表位 $^{116}\text{TSSFETLFEQ}^{125}$ 是线性表位，单抗 5-1C8B6、Q1-1G4B2 和 Q8-4F9F3 识别的表位可能是构象表位。

4、基于 p30 mAb-16-5E7E8 建立了快速检测非洲猪瘟病毒 p30 抗体的竞争化学发光法 p30-cCLIA，该方法的 Cut-off 值为 50%，Dsp 为 100%，Dsn 为 100%，具有较好的重复性和准确率，与商品化阻断 ELISA 试剂盒有很高的符合率，且检测灵敏度更高，检测时间短，仅需 35 分钟，为 ASFV 的早期检测及 ASF 的防控提供有力工具。

参考文献

- [1] 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]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 715582.
- [2] Galindo I, Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review[J]. *Viruses*, 2017, 9(5): 103.
- [3] EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), More S, Miranda M A, et al. African swine fever in wild boar[J]. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 2018, 16(7): e05344.
- [4] Pietschmann J, Mur L, Blome S, et al. African swine fever virus transmission cycles in Central Europe: Evaluation of wild boar-soft tick contacts through detection of antibodies against *Ornithodoros erraticus* saliva antigen[J]. *BMC veterinary research*, 2016, 12: 1.
- [5] Wang M, Song J, Sun J, et al. Development of an Effective Double Antigen Sandwich ELISA Based on p30 Protein to Detect Antibodies against African Swine Fever Virus[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2170.
- [6] Cwynar P, Stojkov J, Wlazlak K. African Swine Fever Status in Europe[J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 310.
- [7] Gaudreault N N, Richt J A. Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus[J]. *Vaccines*, 2019, 7(2): 56.
- [8] Sánchez-Cordón P J, Montoya M, Reis A L, et al. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry[J]. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 2018, 233: 41-48.
- [9] Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, et al. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 198-203.

- [10] Penrith M L, Vosloo W. Review of African swine fever: transmission, spread and control[J]. Journal of the South African Veterinary Association, 2009, 80(2): 58-62.
- [11] Plowright W, Parker J, Peirce M A. African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania[J]. Nature, 1969, 221(5185): 1071-1073.
- [12] Zhou X, Li N, Luo Y, et al. Emergence of African Swine Fever in China, 2018[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(6): 1482-1484.
- [13] Cadenas-Fernández E, Ito S, Aguilar-Vega C, et al. The Role of the Wild Boar Spreading African Swine Fever Virus in Asia: Another Underestimated Problem[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 844209.
- [14] Home - WOA H - World Organisation for Animal Health[EB/OL]. [2024-04-15]. <https://www.woah.org/>.
- [15] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle[J]. Journal of Virology, 2018, 92(23): e01293-18.
- [16] 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]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(1): 1-12.
- [17] Urbano A C, Ferreira F. African swine fever control and prevention: an update on vaccine development[J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 2021-2033.
- [18] Xian Y, Xiao C. The Structure of ASFV Advances the Fight against the Disease[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45(4): 276-278.
- [19] Angulo A, Viñuela E, Alcamí A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12[J]. Journal of Virology, 1993, 67(9): 5463-5471.

- [20] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science (New York, N.Y.), 2019, 366(6465): 640-644.
- [21] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt J A. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches[J]. Advances in Virus Research, 2018, 100: 41-74.
- [22] Cackett G, Matelska D, Sýkora M, et al. The African Swine Fever Virus Transcriptome[J]. Journal of Virology, 2020, 94(9): e00119-20.
- [23] Shimmon G L, Hui J Y K, Wileman T E, et al. Autophagy impairment by African swine fever virus[J]. The Journal of General Virology, 2021, 102(8): 001637.
- [24] Liberti R, Colabella C, Anzalone L, et al. Expression of a recombinant ASFV P30 protein and production of monoclonal antibodies[J]. Open Veterinary Journal, 2023, 13(3): 358-364.
- [25] Zhang G, Liu W, Gao Z, et al. Antigenicity and immunogenicity of recombinant proteins comprising African swine fever virus proteins p30 and p54 fused to a cell-penetrating peptide[J]. International Immunopharmacology, 2021, 101: 108251.
- [26] Hu C, Li S, Zhou J, et al. In vitro SELEX and application of an African swine fever virus (ASFV) p30 protein specific aptamer[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 1-10.
- [27] Jia N, Ou Y, Pejsak Z, et al. Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection[J]. Journal of Veterinary Research, 2017, 61(2): 135-143.
- [28] Barderas M G, Rodríguez F, Gómez-Puertas P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins[J]. Archives of Virology, 2001, 146(9): 1681-1691.
- [29] Oh T, Do D T, Lai D C, et al. Chronological expression and distribution of African swine fever virus p30 and p72 proteins in experimentally infected pigs[J].

- Scientific Reports, 2022, 12(1): 4151.
- [30] Indrabalan U B, Suresh K P, Shivamallu C, et al. An extensive evaluation of codon usage pattern and bias of structural proteins p30, p54 and, p72 of the African swine fever virus (ASFV)[J]. *VirusDisease*, 2021, 32(4): 810-822.
- [31] Beato M S, D'Errico F, Iscaro C, et al. Disinfectants against African Swine Fever: An Updated Review[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1384.
- [32] Gallardo M C, Reoyo A de la T, Fernández-Pinero J, et al. African swine fever: a global view of the current challenge[J]. *Porcine Health Management*, 2015, 1: 21.
- [33] 何健, 石建州, 刘阳坤, et al. 非洲猪瘟病毒研究进展[J]. *南阳师范学院学报*, 2022, 21(1): 55-62.
- [34] Qu H, Ge S, Zhang Y, et al. A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus[J]. *Virus Genes*, 2022, 58(2): 77-87.
- [35] Normile D. Arrival of deadly pig disease could spell disaster for China[J]. *Science* (New York, N.Y.), 2018, 361(6404): 741.
- [36] Zhao D, Sun E, Huang L, et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 3096.
- [37] Ruiz-Saenz J, Diaz A, Bonilla-Aldana D K, et al. African swine fever virus: A re-emerging threat to the swine industry and food security in the Americas[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1011891.
- [38] Sun E, Huang L, Zhang X, et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 2183-2193.
- [39] 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]. *Science China. Life Sciences*, 2021, 64(5): 752-765.

- [40] Sereda A D, Balyshev V M, Kazakova A S, et al. Protective Properties of Attenuated Strains of African Swine Fever Virus Belonging to Seroimmunotypes I-VIII[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2020, 9(4): 274.
- [41] Kholod N, Koltsov A, Krutko S, et al. Comparison of Attenuated and Virulent Strains of African Swine Fever Virus Genotype I and Serogroup 2[J]. Viruses, 2023, 15(6): 1373.
- [42] Sereda A D, Kazakova A S, Namsrayn S G, et al. The attenuated ASFV strains MK-200 and FK-32/135 as possible models for investigation of protective immunity by ASFV infection[J]. PloS One, 2022, 17(7): e0270641.
- [43] Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman E R, et al. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity[J]. The Journal of General Virology, 2015, 96(Pt 4): 866-873.
- [44] Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman E R, et al. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever[J]. The Journal of General Virology, 2016, 97(7): 1670-1675.
- [45] Li Z, Chen W, Qiu Z, et al. African Swine Fever Virus: A Review[J]. Life, 2022, 12(8): 1255.
- [46] 张华莹, 符乐, 王晓芳, 等. 非洲猪瘟诊断技术研究进展[J]. 北方牧业, 2023(20): 15-16.
- [47] 刘桃雪. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备[D]. 河南农业大学, 2024.
- [48] Malmquist W A, Hay D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures[J]. American Journal of Veterinary Research, 1960, 21: 104-108.
- [49] Gonzague M, Roger F, Bastos A, et al. Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar[J]. Epidemiology and Infection, 2001, 126(3): 453-459.
- [50] Oura C A L, Edwards L, Batten C A. Virological diagnosis of African swine

- fever—Comparative study of available tests[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 150-158.
- [51] Wardley R C, Abu Elzein E M, Crowther J R, et al. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever virus antigen and antibody[J]. *The Journal of Hygiene*, 1979, 83(2): 363-369.
- [52] Vidal M I, Stiene M, Henkel J, et al. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies[J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, 66(2): 211-218.
- [53] Steiger Y, Ackermann M, Mettraux C, et al. Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(1): 1-8.
- [54] Belák S, Thorén P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2001, 1(4): 434-443.
- [55] Agüero M, Fernández J, Romero L, et al. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(9): 4431-4434.
- [56] Bastos A D S, Penrith M L, Crucière C, et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation[J]. *Archives of Virology*, 2003, 148(4): 693-706.
- [57] 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]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 178(1-2): 161-170.
- [58] King D P, Reid S M, Hutchings G H, et al. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 107(1): 53-61.

- [59] Ronish B, Hakhverdyan M, Ståhl K, et al. Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 172(1-2): 8-15.
- [60] Zhu J, Weijun J, Huang Y, et al. Development and Application of a Duplex Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Assay for Detection and Differentiation of EP402R-Deleted and Wild-Type African Swine Fever Virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022: 905706.
- [61] Wu X, Xiao L, Lin H, et al. Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 2018, 82(1): 70-74.
- [62] 张圆圆, 靳家鑫, 赵旭阳, 等. 非洲猪瘟新型诊断方法研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(10): 62-71.
- [63] 王宏燕, 杨作丰, 李秀梅, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光环介导等温扩增方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(2): 27-30+2.
- [64] Wang Y, Xu L, Noll L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of African swine fever virus with an endogenous internal control[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(6): 2446-2454.
- [65] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS biology*, 2006, 4(7): e204.
- [66] 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]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1696.
- [67] Wang Z, Yu W, Xie R, et al. A strip of lateral flow gene assay using gold nanoparticles for point-of-care diagnosis of African swine fever virus in limited environment[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(18): 4665-

- 4672.
- [68] Miao F, Zhang J, Li N, et al. Rapid and Sensitive Recombinase Polymerase Amplification Combined With Lateral Flow Strip for Detecting African Swine Fever Virus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1004.
- [69] Tian T, Qiu Z, Jiang Y, et al. Exploiting the orthogonal CRISPR-Cas12a/Cas13a trans-cleavage for dual-gene virus detection using a handheld device[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 196: 113701.
- [70] Yang B, Shi Z, Ma Y, et al. LAMP assay coupled with CRISPR/Cas12a system for portable detection of African swine fever virus[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): e216-e223.
- [71] Lin M, Yue H, Tian T, et al. Glycerol Additive Boosts 100-fold Sensitivity Enhancement for One-Pot RPA-CRISPR/Cas12a Assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(23): 8277-8284.
- [72] Pastor M J, Arias M, Escibano J M. Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51(10): 1540-1543.
- [73] Li D, Zhang Q, Liu Y, et al. Indirect ELISA Using Multi-Antigenic Dominants of p30, p54 and p72 Recombinant Proteins to Detect Antibodies against African Swine Fever Virus in Pigs[J]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2660.
- [74] Li C, He X, Yang Y, et al. Rapid and visual detection of African swine fever virus antibody by using fluorescent immunochromatography test strip[J]. *Talanta*, 2020, 219: 121284.
- [75] 张挺杰. 表达 PCV2 ORF2 基因的重组猪繁殖与呼吸综合征病毒的构建及其免疫保护效力研究[D]. 南京农业大学, 2017.
- [76] 张鑫宇, 左伟勇, 朱善元, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗体胶体金试纸检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(4): 281-285.
- [77] Heimerman M E, Murgia M V, Wu P, et al. Linear epitopes in African swine fever

- virus p72 recognized by monoclonal antibodies prepared against baculovirus-expressed antigen[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2018, 30(3): 406-412.
- [78] Indirect Immunoperoxidase Test (IPT) for Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus (ASFV) on African Green Monkey Cell Lines (Vero, MS) | SpringerLink[EB/OL]. [2024-04-18].
- [79] Fekete S, Veuthey J L, Guillarme D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 69: 9-27.
- [80] Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109(1): 169-190.
- [81] Van Hoecke L, Roose K. How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field[J]. Journal of Translational Medicine, 2019, 17(1): 54.
- [82] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.
- [83] Emmons C, Hunsicker L G. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use[J]. Iowa Medicine: Journal of the Iowa Medical Society, 1987, 77(2): 78-82.
- [84] Gao Y, Huang X, Zhu Y, et al. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays[J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2018, 39(4): 351-364.
- [85] Chiarella P. Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies[J]. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2011, 6(2): 258-267.

- [86] Han L na, He S, Wang Y tang, et al. Advances in monoclonal antibody application in myocarditis[J]. Journal of Zhejiang University. Science. B, 2013, 14(8): 676-687.
- [87] Li J, Zhu Z. Research and development of next generation of antibody-based therapeutics[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(9): 1198-1207.
- [88] 程晶, 刘文晓, 王晓玥, 等. 非洲猪瘟诊断方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(5): 1985-1993.
- [89] Jin J, Bai Y, Zhang Y, et al. Establishment and characterization of a novel indirect ELISA method based on ASFV antigenic epitope-associated recombinant protein[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253(Pt 7): 127311.
- [90] Qiu Z, Li Z, Yan Q, et al. Development of Diagnostic Tests Provides Technical Support for the Control of African Swine Fever[J]. Vaccines, 2021, 9(4): 343.
- [91] Wang A, Jiang M, Liu H, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against the N-terminal domain of African swine fever virus structural protein, p54[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180: 203-211.
- [92] Halmann M, Velan B, Sery T. Rapid identification and quantitation of small numbers of microorganisms by a chemiluminescent immunoreaction[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 34(5): 473-477.
- [93] Mirasoli M, Guardigli M, Michelini E, et al. Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87: 36-52.
- [94] 刘伟. O型口蹄疫病毒抗体及3ABC抗体快速检测化学发光法的建立[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [95] 杨晓燕. 增强化学发光分析新体系的研究及其在免疫分析中的应用[D]. 青岛科技大学, 2009.

- [96] Ashenagar M S, Matsumoto A, Sakai H, et al. Comparison of CLEIA and ELISA for SARS-CoV-2 Virus Antibodies after First and Second Dose Vaccinations with the BNT162b2 mRNA Vaccine[J]. *Vaccines*, 2022, 10(4): 487.
- [97] Salvagno G L, Henry B M, De Nitto S, et al. Clinical performance of Fujirebio Lumipulse G SARSCoV- 2 Ag chemiluminescent immunoassay[J]. *The New Microbiologica*, 2022, 45(4): 353-354.
- [98] Richter M M. Electrochemiluminescence (ECL)[J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [99] 金茂俊, 杜鹏飞, 杨丽华, 等. 基于磁性纳米粒子的免疫分析方法在食品安全检测中的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(22): 9431-9432+9439.
- [100] Kolesova O, Tomassetti F, Cerini P, et al. Evaluation of ECLIA antigen detection tests as screening methods for COVID-19 in comparison with molecular analysis[J]. *Irish Journal of Medical Science*, 2022, 191(5): 2213-2217.
- [101] Raman D, Tiwari A K. Role of eIF4A1 in triple-negative breast cancer stem-like cell-mediated drug resistance[J]. *Cancer Reports (Hoboken, N.J.)*, 2022, 5(12): e1299.
- [102] Teimouri A, Modarressi M H, Shojaee S, et al. Detection of toxoplasma-specific immunoglobulin G in human sera: performance comparison of in house Dot-ELISA with ECLIA and ELISA[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2018, 37(8): 1421-1429.
- [103] Kombe Kombe A J, Xie J, Zahid A, et al. Detection of Circulating VZV-Glycoprotein E-Specific Antibodies by Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) for Varicella-Zoster Diagnosis[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(1): 66.
- [104] Fu H J, Yuan L P, Shen Y D, et al. A full-automated magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for rapid detection of cortisol in milk[J].

- Analytica Chimica Acta, 2018, 1035: 129-135.
- [105] Wang F, Ma C, Zeng X, et al. Chemiluminescence molecular detection of sequence-specific HBV-DNA using magnetic nanoparticles[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2012, 8(5): 786-790.
- [106] Franzoni G, Zinellu S, Razzuoli E, et al. Assessment of the Impact of a Toll-like Receptor 2 Agonist Synthetic Lipopeptide on Macrophage Susceptibility and Responses to African Swine Fever Virus Infection[J]. Viruses, 2022, 14(10): 2212.
- [107] Cubillos C, Gómez-Sebastian S, Moreno N, et al. African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples[J]. Virus Research, 2013, 173(1): 159-167.
- [108] Silva E B, Krug P W, Ramirez-Medina E, et al. The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV live Attenuated Vaccine Candidates[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2022, 11(11): 1311.
- [109] Zsak L, Onisk D V, Afonso C L, et al. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein[J]. Virology, 1993, 196(2): 596-602.
- [110] Escribano J M, Galindo I, Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts[J]. Virus Research, 2013, 173(1): 101-109.
- [111] Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the beta 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase[J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 60(3): 351-358.
- [112] Cao B lei, Qiu H kai, Hu J dong, et al. Characterization of monoclonal antibodies

- against goat interleukin-18 and their application in the measurement of goat interleukin-18 in LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells by sandwich ELISA[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 138(3): 235-238.
- [113] Miao C, Yang S, Shao J, et al. Identification of p72 epitopes of African swine fever virus and preliminary application[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1126794.
- [114] Wu P, Lowe A D, Rodríguez Y Y, et al. Antigenic regions of African swine fever virus phosphoprotein P30[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(5): 1942-1953.
- [115] Petrovan V, Yuan F, Li Y, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus[J]. *Virus Research*, 2019, 269: 197632.
- [116] 孙爱军, 王芮, 朱潇静, 等. 非洲猪瘟相关检测及猪场生物安全防控研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(5): 1023-1030.
- [117] Zhou L, Song J, Wang M, et al. Establishment of a Dual-Antigen Indirect ELISA Based on p30 and pB602L to Detect Antibodies against African Swine Fever Virus[J]. *Viruses*, 2023, 15(9): 1845.
- [118] Zhou J, Ni Y, Wang D, et al. Development of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Targeting the-p30 Protein for Detection of Antibodies against African Swine Fever Virus[J]. *Viruses*, 2023, 15(1): 154.
- [119] Yu X, Zhu X, Chen X, et al. Establishment of a Blocking ELISA Detection Method for Against African Swine Fever Virus p30 Antibody[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 781373.