

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

非洲猪瘟病毒 p30 和 p54 蛋白 单克隆抗体的制备

硕 士 研 究 生: 冯春莹

学 号: 821012115615

指 导 教 师: 黄丽 研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Preparation of Monoclonal Antibodies against African Swine Fever Virus p30 and p54 Proteins

Candidate: FENG Chunying

Student ID: 821012115615

Supervisor: Professor HUANG Li

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2024

摘 要

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）引起猪的急性、烈性、高度接触性传染病。临床症状表现为发热、呕吐、食欲废绝、皮肤充血发绀等；内脏病变主要表现为脾肿大、脏器及内脏淋巴结出血及腔内分泌物增多。ASF 传入我国后，给我国养猪业造成了巨大的经济损失。目前，国内仍无安全、有效的疫苗用于 ASF 的预防。因此，早期诊断并及时捕杀感染动物是防控 ASF 疫情的必要措施。ASFV 编码的 p30 和 p54 蛋白均具有良好的抗原性，是 ASFV 早期诊断的优良靶标。单克隆抗体（MAb）是病毒蛋白的结构及功能研究、诊断试剂研发的重要工具，可为 ASF 防控产品的研发提供重要材料。制备抗 ASFV p30 和 p54 MAb 可为 ASF 防控产品的研发提供重要工具。

本研究构建了重组原核表达质粒 pET-21a-CP204L 和 pET-21a-E183L，经诱导表达后利用 Ni^{2+} 柱纯化获得 p30 和 p54 重组蛋白。将 p30 和 p54 蛋白免疫 BALB/c 小鼠，经细胞融合及筛选，获得了能够稳定分泌抗 p30 和 p54 蛋白 MAb 的杂交瘤细胞株。蛋白免疫印迹（Western blotting）和间接免疫荧光（IFA）鉴定结果显示，本研究获得的 MAbs 可分别与 HEK293T 细胞中外源表达的 p30 和 p54 蛋白，以及 ASFV 感染的 PAMs 中表达的 p30 和 p54 蛋白发生反应，表明本研究制备的 MAbs 具有良好的特异性和反应性，为后续的研究奠定了基础。

杂交瘤技术是抗体制备最常用的技术，该技术需要反复采用筛选的杂交瘤细胞制备腹水再经纯化获得抗体，若杂交瘤细胞株保存不当或细胞污染均可能造成该株抗体的丢失。近年来，重组抗体制备技术逐渐兴起，该技术可将抗体的可变区序列连接至表达抗体恒定区的载体中，构建抗体的重组表达质粒，转染真核系统表达后获得的抗体具有来源稳定、产量高，重组质粒易于保存等优点。为了对杂交瘤技术筛选得到的抗体进行更好的保存，本研究分别对杂交瘤细胞的抗体重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）基因进行扩增，并分别连接至含有抗体重链及轻链恒定区的 pcDNA3.4 载体中，构建抗体的真核表达质粒。将抗体重链和轻链表达质粒共转染 HEK293T 细胞 96 h 后，收集培养液，Western blotting 检测结果表明重组抗体 p30 R-MAb 和 p54 R-MAb 成功表达。随后采用 Western blotting 和 IFA 试验鉴定重组抗体的反应性，重组抗体可分别与 HEK293T 细胞中过表达的 p30 和 p54 蛋白，以及 ASFV 感染 PAMs 中表达的 p30 和 p54 蛋白发生反应。

综上所述，本研究成功制备了抗 ASFV p30 和 p54 蛋白的 MAb，为了抗体更好的进行保存及纯化，将其杂交瘤细胞的抗体可变区克隆至重组抗体表达载体进行表达。为 ASFV 诊断技术的开发和 p30、p54 蛋白功能特性的进一步研究提供支撑。

关键词：非洲猪瘟病毒，单克隆抗体，杂交瘤技术，重组抗体表达

Abstract

African swine fever (ASF) is an acute, virulent and highly contagious infectious disease in pigs caused by African swine fever virus (ASFV). The infected pigs develop fever, vomiting, loss of appetite, skin congestion, and cyanosis; visceral lesions are mainly manifested as splenomegaly, organ and visceral lymph node hemorrhage, and increased endocervical secretion. Since the epidemic of ASF, it has caused immense economic losses to China's pig industry, and there is still no effective vaccine for prevention. Both p30 and p54 proteins encoded by ASFV have good antigenicity and can induce the production of neutralizing antibodies, which are excellent targets for early diagnosis of ASFV. Monoclonal antibodies. Monoclonal antibody (MAb) is an essential tool for studying the structure and function of viral proteins and developing diagnostic reagents. The preparation of anti-ASFV p30 and p54 MAb can provide vital materials for developing ASF prevention and control products.

In this study, we constructed recombinant prokaryotic expression plasmids pET-21a-CP204L and pET-21a-E183L and purified the recombinant proteins p30 and p54 using Ni^{2+} column. We immunized BALB/c mice with p30 and p54 proteins; hybridoma cell lines that can secrete MAb specifically against p30 and p54 proteins were successfully screened out. The results of Western blotting and indirect immunofluorescence (IFA) showed that they could respectively recognize the endogenous expression of p30 and p54 protein in HEK293T cells and ASFV-infected porcine alveolar macrophages (PAMs). These results fully demonstrate the excellent specificity and reactivity of the prepared MAb, providing a solid foundation for subsequent research.

Hybridoma technology is the most commonly used technology for antibody preparation, which requires repeated use of screened hybridoma cells to prepare ascites and purify to obtain antibodies. Improper preservation of hybridoma cell lines or cell contamination may result in the loss of antibodies. In recent years, recombinant antibody preparation technology has gradually emerged. This technology can connect the variable region sequence of antibody to the vector expressing the constant region of antibody, and construct the recombinant expression plasmid of antibody. The antibodies obtained after transfection into the eukaryotic system have the advantages of stable source, high yield, and easy preservation of the recombinant plasmid. In order to better preserve the antibody screened by hybridoma technology, this study amplified the genes of antibody heavy chain variable region (VH) and light chain variable region (VL) of hybridoma cells, and connected them to pcDNA3.4 vector containing antibody heavy chain and constant light chain region, respectively, to construct the eukaryotic expression plasmid of antibody. After co-transfection of HEK293T cells for 96 h, the supernatant of the culture medium was collected to detect the expression of recombinant antibodies p30 R-MAb and p54 R-MAb. Subsequently, Western blotting and IFA tests were used to identify the reactivity of the recombinant antibodies. The results showed that they could respectively recognize the endogenous expression of p30 and p54 protein in HEK293T cells and ASFV-infected PAMs.

In this study, anti-ASFV p30 and p54 proteins MAb were successfully prepared. In order to better

preserve and purify antibodies, the antibody variable region of hybridoma cells was cloned into recombinant antibody expression vector for expression. It provides support for the development of ASFV diagnostic technology and further study of p30 and p54 protein functional characteristics.

Keywords: African swine fever virus, Monoclonal antibody, Hybridoma technology, Recombinant antibody expression

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 非洲猪瘟.....	1
1.1.1 ASF 流行病学.....	1
1.1.2 ASF 的预防与控制.....	1
1.2 非洲猪瘟病毒.....	2
1.2.1 ASFV 粒子结构.....	2
1.2.2 ASFV 的理化性质.....	2
1.2.3 ASFV 编码的主要病毒蛋白.....	2
1.3 ASFV 检测方法.....	3
1.3.1 ELISA	3
1.3.2 免疫层析检测.....	4
1.3.3 q-PCR.....	4
1.3.4 LAMP.....	4
1.3.5 RPA	4
1.4 抗体制备技术.....	5
1.4.1 杂交瘤技术.....	5
1.4.2 噬菌体展示技术.....	5
1.4.3 核糖体展示技术.....	6
1.4.4 单个 B 细胞抗体技术.....	6
1.5 研究目的及意义.....	8
第二章 鼠抗 ASFV p30 和 p54 单克隆抗体的制备	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 细胞、病毒、质粒及实验动物.....	9
2.1.2 主要试剂.....	9
2.1.3 主要溶液与配方	9
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 pET-21a-CP204L、pET-21a-E183L 重组质粒的构建	10
2.2.2 pET-21a-CP204L、pET-21a-E183L 重组质粒的原核表达	11
2.2.3 p30、p54 重组蛋白的纯化.....	11
2.2.4 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 检测.....	11
2.2.5 纯化重组蛋白的 Western blotting 检测	11
2.2.6 动物免疫及采血.....	12
2.2.7 间接 ELISA 检测小鼠血清效价	12
2.2.8 细胞融合	12

2.2.9 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆.....	13
2.2.10 腹水制备.....	13
2.2.11 Western blotting 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性	13
2.2.12 Western blotting 鉴定 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性	13
2.2.13 IFA 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性.....	13
2.2.14 IFA 鉴定 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性.....	14
2.2.15 MAb 亚类鉴定	14
2.2.16 MAb 抗原表位鉴定	14
2.3 结果.....	14
2.3.1 p30 和 p54 重组蛋白的原核表达.....	14
2.3.2 p30 和 p54 重组蛋白的纯化和鉴定.....	15
2.3.3 免疫小鼠血清效价检测.....	16
2.3.4 Western blotting 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性	16
2.3.5 Western blotting 鉴定 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性	17
2.3.6 IFA 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性.....	17
2.3.7 IFA 鉴定 p30 和 p54 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性	18
2.3.8 MAb 亚类鉴定	18
2.3.9 抗 p54 蛋白 MAb 抗原表位鉴定	19
2.4 讨论.....	20
2.5 小结.....	21
第三章 重组抗体表达系统构建	22
3.1 实验材料.....	22
3.1.1 细胞、病毒、质粒.....	22
3.1.2 主要试剂.....	22
3.1.3 主要溶液与配方.....	22
3.2 实验方法.....	22
3.2.1 单克隆细胞株 RNA 的提取及反转录	22
3.2.2 VH 和 VL 基因的扩增及克隆.....	23
3.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测.....	23
3.2.4 重组抗体质粒制备	23
3.2.5 重组抗体的表达.....	24
3.2.6 重组抗体的鉴定.....	24
3.3 结果.....	24

3.3.1 VH 及 VL 基因 PCR 扩增结果	24
3.3.2 VH 及 VL 序列比对及分析	25
3.3.3 表达重组抗体的 Western blotting 检测	26
3.3.4 Western blotting 鉴定重组抗体与的 p30 和 p54 蛋白的反应性	27
3.3.5 IFA 鉴定重组抗体与的 p30 和 p54 蛋白的反应性	28
3.4 讨论	29
3.5 小结	30
第四章 结论	31
参考文献	32

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
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
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
MAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
PAMs	Porcine alveolar macrophages	猪肺泡巨噬细胞
PDT	phage display techniques	噬菌体展示技术
q-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
RPA	Recombinase polymerase amplification	重组酶聚合酶扩增技术
VH	Variable region of heavy chain	重链可变区
VL	Variable region of light chain	轻链可变区

第一章 绪论

1.1 非洲猪瘟

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）引起的急性、烈性传染病，ASFV 强毒株感染对家猪的致死率高达 100%（DIXON et al., 2013）。

1.1.1 ASF 流行病学

ASF 最早在 1921 年爆发于肯尼亚，随后传播至撒哈拉以南国家，于 20 世纪 50 年代到达西非（MUSHAGALUSA et al., 2021; EUSTACE MONTGOMERY, 1921）。1957 年，ASF 首次传入欧洲，此后一直在西班牙和葡萄牙流行，然后扩散到了其它欧洲国家、加勒比和南美洲。2007 年，格鲁吉亚首次报道 ASF，之后进一步向北和向东蔓延（DIXON et al., 2019）。2018 年 8 月 3 日，辽宁省首次出现 ASF，我国农业农村部立即启动应急响应，虽然及时采取了措施，但该病传播十分迅速，仍在全国范围内发生了流行（GE et al., 2018; ZHOU et al., 2018）。我国是世界上最大的猪肉生产国，占全世界猪肉产量的 50% 左右，此次 ASF 疫情给我国猪肉产业造成了沉重打击和巨大的经济损失，影响了我国养猪产业的发展。

ASF 发病猪和带毒猪是主要传染源，而猪与野猪则是其易感动物。值得注意的是，软蜱不仅能够作为 ASFV 的贮藏宿主，还可作为病毒传播的媒介，在病毒的流行中扮演了重要角色，这些复杂因素共同决定了 ASFV 的传播模式和流行特点（PENRITH et al., 2009）。ASFV 能够通过直接接触、饮水、气溶胶、蜱虫叮咬和注射等多种方式进行传播，主要传播方式为粪-口途径传播（董娜, 2023）。

1.1.2 ASF 的预防与控制

自 2018 年以来，ASF 迅速流行，并且目前仍无有效的 ASF 疫苗，也无有效的治疗方式，给我国养猪业造成了巨大威胁（仇华吉, 2018）。现阶段 ASF 的主要防控方式是通过尽早发现，及时隔离、扑杀、消毒、限制流通等方法，阻止疫情的传播，快速、精准的诊断是 ASF 流行病学管理的关键（WU et al., 2020）。

在控制传染源方面，由于 ASFV 可以长期存在于猪群和环境，因此对带毒猪、病死猪及其排泄物进行无害化处置是保障生猪健康安全的关键（GUINAT et al., 2017; 陆田甜 等, 2023）。在切断传播途径方面，养殖场需要制定严格的消毒前清洁和消毒后监测程序（KAHRS, 1995; REICKS, 2019）；养殖场可采用全进全出饲喂方式，同时，在新猪进场前，应做好检测工作，防止带毒猪入场，造成病毒的传播；我国海关部门必须对猪源产品进行严格的检验检疫，防止不合格的猪肉产品入境，国际航班、轮船或火车上的剩余食物应妥善处理（SáNCHEZ-VIZCAÍNO et al., 2012）。在保护易感动物方面，接种疫苗是控制动物病毒性疾病的最佳措施，然而目前还没有有效的疫苗可以提高动物抵抗 ASF 的能力（张依玲 等, 2023）。

1.2 非洲猪瘟病毒

1.2.1 ASFV 粒子结构

ASFV 是非洲猪瘟病毒科的唯一成员 (DIXON et al., 2019)。ASFV 粒子呈二十面体对称结构, 直径约为 250 nm, 由中心核仁、核壳、内层囊膜、衣壳和外囊膜组成 (WANG et al., 2019; SALAS et al., 2013)。基因组长度为 170-190 kb, 包括 151-167 个开放阅读框, 可编码 150-200 种蛋白质 (ROJO et al., 1999)。

1.2.2 ASFV 的理化性质

ASFV 对低温的抵抗力很强, 在病猪排泄物、血液、尸体及肉类产品中均可存活不同时间, 在冷藏肉类中存活 15 周仍有感染性, 在冷冻肉中能存活数年, 在 4℃存放的新鲜血液中可存活 18 个月以上。病毒粒子对酸碱不敏感, 在 pH 4-10 的无血清培养基中可正常生存。

ASFV 对高温的抵抗力较弱, 56℃ 70 min 和 60℃ 30 min 条件下均可将其灭活 (扈荣良 等, 2019)。对一些常用的消毒剂也敏感, 0.8% 烧碱 30 min、0.3% 福尔马林 30 min、次氯酸盐 (2.3% 有效氯) 30 min、3% 邻苯基苯酚 30 min 都可将其杀灭 (杨磊 等, 2020)。

1.2.3 ASFV 编码的主要病毒蛋白

ASFV 蛋白包括主要结构蛋白、病毒装配相关蛋白、病毒生物学加工所需的蛋白等。

p30 由 *CP204L* 基因编码, 分子量约为 30 kDa, 位于病毒粒子的内囊膜中 (KAZAKOVA et al., 2017)。p30 为 ASFV 的早期蛋白, 在 ASFV 感染的早期阶段 (2-4 h) 即可被检测到, 随着感染时间的延长, 约 12 h 后其表达量开始下降。因此, p30 是开发 ASFV 检测方法的优良靶蛋白 (PETROVAN et al., 2019)。此外, p30 蛋白还可参与病毒内化到宿主细胞的过程 (GÓMEZ-PUERTAS et al., 1996)。

p54 蛋白由 *E183L* 基因编码, 分子量约为 25 kDa, 也位于病毒粒子的内囊膜中 (RODRIGUEZ et al., 1996), 是构成病毒粒子的重要结构蛋白之一, 在组装 ASFV 粒子和介导细胞凋亡方面都有至关重要的作用 (GÓMEZ-PUERTAS et al., 1996; DIXON et al., 2017)。p54 蛋白具有很好的抗原性, 能够有效诱导机体产生强烈的免疫应答反应, 这一特性使得 p54 蛋白在免疫学研究及疫苗开发中展现出重要的应用潜力。在 ASFV 感染初期, 机体即可产生针对 p54 蛋白的特异性抗体, 且抗体水平在感染后 14-39 d 内持续维持在高位 (REIS et al., 2007)。因此, p54 蛋白也是 ASFV 免疫学检测和血清学诊断的理想抗原。

p72 蛋白由 *B646L* 基因编码, 分子量约为 73 kDa, 是衣壳的主要组成部分 (CARRASCOSA et al., 1984), 常以三聚体的形式存在。p72 蛋白产生于病毒感染晚期, 具有高免疫原性, 已被有效地用作血清学诊断靶标 (GAUDREAULT et al., 2019; ONZERE et al., 2018)。基于 p72 的检测方法是目前市场上最灵敏的 ASFV 检测技术 (GÓMEZ-PUERTAS et al., 1996)。此外, p72 蛋白还参与病毒的内化 (吴萌萌 等, 2022)。

CD2v 蛋白由 *EP402R* 基因编码, 是迄今为止唯一通过实验鉴定的 ASFV 外囊膜糖蛋白 (ALEJO et al., 2018)。CD2v 蛋白可与猪红细胞结合, 进而介导病毒的感染, 它不是病毒复制的

必需基因，却是病毒毒力基因（LU et al., 2023）。同时，使用 CD2v 基因缺失疫苗进行免疫，可对同源毒株提供保护，已被用于基因缺失疫苗的开发（HEMMINK et al., 2022; PÉREZ-NÚÑEZ et al., 2022）。

此外，pp220 和 pp62 存在于核心壳中，可被 pS273R 蛋白酶切割，分别产生 p5、p14、p34、p37 和 p150 以及 p8、p15 和 p35，对于 ASFV 的成熟和传染性具有重要作用（ANDRÉS et al., 2002）。pA104R 位于类核中，与类核组装有关，对 ASFV 基因组包装和复制至关重要（ALEJO et al., 2018）。

1.3 ASFV 检测方法

当前 ASFV 检测技术主要分为病原学检测和血清学检测两大类。病原学检测是针对 ASFV 自身的检测，主要包括实时荧光定量 PCR（q-PCR）、环介导等温扩增（LAMP）、重组酶聚合酶扩增技术（RPA）等技术；血清学检测分为抗原和抗体检测，主要包括酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫层析检测等技术。

1.3.1 ELISA

ELISA 是一种依赖于抗原和抗体特异性结合的检测技术，ASF 目前没有疫苗，检测时不会受免疫抗体的影响，且 ELISA 技术成本低，一次可检测大量样品，是 WOAH 推荐的检测技术之一。关于 ASFV ELISA 检测试剂盒，市面上已有多种国外品牌，如西班牙 Ingenasa 公司、瑞典 Svanova 公司以及法国 ID Vet 公司等均有相关产品生产（SASTRE et al., 2016; CARLSON et al., 2018）。在我国，2021 年 7 月共有 33 种 ASFV 抗体检测试剂盒通过专家评审，这些试剂盒类型大部分为间接 ELISA 和阻断 ELISA，主要以 p72、p30、p54 等重组蛋白作为诊断的关键靶标。其中，北京金诺百泰公司、武汉科前公司研发的间接 ELISA、杭州恒奥公司研发的阻断 ELISA 等试剂盒，目前均已实现商品化。

有研究使用针对 p54 蛋白的 MAbs 成功构建了阻断 ELISA 方法。实验结果表明，该方法与 PRV、PRRSV、CSFV、PCV2、SVA 等血清抗体无交叉反应，具有优异的敏感性和特异性，适用于 ASF 的检测和流行病学研究（GAO et al., 2023）；有研究运用噬菌体展示技术，成功筛选出七个针对 p30 蛋白的纳米抗体，他们进一步将这些纳米抗体与辣根过氧化物酶（HRP）融合，实现了分泌表达，最终以灵敏度最高的融合蛋白 ASFV-p30-Nb75-HRP 为探针开发了一种竞争性 ELISA 检测方法，与商业 ELISA 试剂盒的一致性为 100%，与抗其他猪病毒抗体无交叉反应（ZHAO et al., 2023）；SHEN 等以截短 I329L 蛋白（70-237 aa）为抗原开发了一种间接 ELISA 方法，临界值为 0.384，与市售试剂盒的符合率为 96.77%，未观察到与 CSFV、PRRSV、PCV2 或 PRV 抗体阳性猪血清的交叉反应，具有良好的特异性和灵敏性（SHEN et al., 2023）；Nah 等人开发了基于重组跨膜结构域缺失的 p22 和 p30 抗原的间接 ELISA 检测方法，灵敏度和特异性分别为 93.5% 和 99.8%（NAH et al., 2022）；Lv 等人通过 CHO 细胞表达和纯化 CD2v 和 p30 蛋白，并成功建立了 ELISA，可用于区分感染野生型 ASFV 或 CD2v 未表达的低毒力突变体的猪（Lv et al., 2021）。

1.3.2 免疫层析检测

免疫层析检测方法简单快速、特异性高，并提供可视化结果，非常适合 ASFV 的现场检测。有研究以胶体金标记的 p30 重组蛋白为金标记抗原，葡萄球菌蛋白 A 为检测线（T 线）开发了 ASFV 胶体金检测试纸，该试纸灵敏度为 90.9%，特异性为 96.2%，优于商业 ELISA 试剂盒（LIU et al., 2024）；以金标记的 p30 和 p72 蛋白混合物作为金标记抗原，开发针对 p30 和 p72 蛋白抗体的胶体金双免疫层析法，在 5-10 min 内就可以完成对 ASFV 抗体的特异性检测（WAN et al., 2022）。此外，通过引入不同的金标记抗原，胶体金免疫层析还可以同时检测不同的病原。Sastre 等人开发了一种基于 ASFV 的 p72 蛋白和 CSFV 的 E2 蛋白的双流侧向层析测定方法，该方法能同时检测针对 ASFV 和 CSFV 的抗体（SASTRE et al., 2016）。

1.3.3 q-PCR

q-PCR 技术简单快速，也具有高灵敏度和特异性，对样本纯度要求低，q-PCR 技术是对病毒本身的一种有效定性及定量检测方法。

B646L 是 WOA 推荐的 ASFV 诊断靶基因，已被广泛使用多年。针对 ASFV 基因型 I 型和 II 型的 *B646L* 序列设计探针和引物，成功建立同时检测 I 型和 II 型 ASFV 的 q-PCR 方法，该方法最低检出限为 10 拷贝/ μL （CAO et al., 2022）。随着对 ASFV 相关基因的进一步研究，已经鉴定出越来越多的靶基因用于检测，如 *MGF505-7R*、*E183L*、*9GL*、*E248R*、*A137R* 等基因（HU et al., 2023）。此外，与常规 q-PCR 相比，多重 q-PCR 特异性更高，需要的样品量少，还可以同时检测多个病原体或突变毒株。有研究基于 *B646L* 基因成功开发了一种具有高特异性、灵敏度和重复性的一步法多重 q-PCR 检测方法，用于对 ASFV、CSFV 和 APPV 的同时和差异检测（LIU et al., 2022）；基于 *B646L* 基因、ASFV 基因 I 型的 *F1055L* 基因和基因 II 型的 *E183L* 基因，优化反应条件后开发可用于区分 ASFV 基因 I 型和 II 型的三重 q-PCR 方法（QIAN et al., 2023）；Yang 等人开发了基于 *B646L*、*MGF360-14L* 和 *EP402R* 基因的三重 q-PCR 检测方法，该方法可区分 ASFV 基因缺失和野生型毒株（YANG et al., 2022）。

1.3.4 LAMP

LAMP 技术费用低，且结果可以用肉眼观察，根据浑浊度就能判断扩增与否。LAMP 方法需要设计 4 种引物，这些引物分别识别靶基因上的 6 个区域，然后加入 DNA 聚合酶，在恒温条件下就能进行扩增（NOTOMI et al., 2000）。目前研究人员已开发出多种 LAMP 方法，用来检测特定的病毒基因。有研究针对 p10 基因设计了 LAMP 引物，经体系优化后能够准确、特异地检测 ASFV，检测限为 30 拷贝/ μL （WANG et al., 2020）；针对 *B646L* 基因设计的 LAMP 方法对 ASFV 的检出限为 0.5 拷贝/ μL （WANG et al., 2022）。LAMP 技术对操作人员和环境要求较高，气溶胶污染后易出现假阳性。

1.3.5 RPA

与常规 PCR 相比，RPA 在 37-42°C 条件下就可以操作，具有高灵敏度、便携性好、用时短

(10 min 内就可完成)等优点。RPA 技术与重组酶介导的扩增技术(RAA)仅有重组酶的区别。Ceruti 等人建立了基于 ASFV 编码 *B646L* 基因的 RPA 检测方法,灵敏度为 3.5 拷贝/ μL (CERUTI et al., 2021)。此外,研究人员也将 RPA 和多种方法相结合,以实现 ASFV 的快速可视化识别,提升检测的效率。有研究将 RPA 与核酸试纸相结合,可同时检测 ASFV 和 CSFV,该方法与常规 PCR 的阳性符合率分别为 94.1%和 57.1% (WU et al., 2021);将 RPA 与量子点微球相结合,使用该方法检测 120 份临床猪肉样本中的 ASFV,检测结果与 q-PCR 的一致性为 99.17% (WEN et al., 2022)。

1.4 抗体制备技术

1.4.1 杂交瘤技术

杂交瘤技术是目前制备抗体最常用的技术。它是利用骨髓瘤细胞可无限增殖和 B 细胞可产生抗体的特点,将两种细胞融合进而获得能增殖且能分泌免疫球蛋白的杂交瘤细胞。其主要流程包括动物免疫、脾细胞与骨髓瘤细胞融合、阳性杂交瘤细胞的筛选、亚克隆和抗体纯化,最后获得仅针对一个抗原表位的单克隆细胞株(武荣飞 等, 2022)。目前杂交瘤技术采用的免疫对象主要是小鼠,免疫的抗原为蛋白或病毒。细胞融合技术包括化学融合、病毒融合及电融合,最常用的是使用聚乙二醇(PEG)进行化学融合(ECKER et al., 2015)。在筛选阳性杂交瘤细胞的过程中,关键步骤是使用 HAT 选择培养基除去因未融合而死亡的细胞,已融合的杂交瘤细胞能够在 HAT 培养基中存活并增殖(LIU, 2014)。筛选后进行亚克隆。获得 MAbs 细胞株后,可收集其培养上清进行纯化,也可以将该细胞株对小鼠进行腹腔注射,一定时间后收集腹水,腹水纯化后获得 MAbs。杂交瘤细胞技术是目前制备 MAbs 最成熟、最常用的方法,但筛选得到杂交瘤细胞株后,保存不当或细胞污染均可能造成该株抗体的丢失。

1.4.2 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术(PDT)通过基因融合的方式,将目标蛋白的编码基因与噬菌体表面蛋白的编码基因融合表达,最终实现目标蛋白在噬菌体表面的展示。该技术的关键点包括建库和筛选(刘铭赫 等, 2022)。在利用 PDT 来制备抗体时,需要先从 B 淋巴细胞中扩增抗体的 VH 和 VL 基因文库,将抗体片段群与噬菌体衣壳蛋白融合表达并展示,形成噬菌体展示抗体库(WEINER et al., 2010),其抗体形式包括抗原结合片段(Fab, 由整个轻链及重链的可变区和第一恒定区片段组成)、单链可变片段(scFvs, 由重链和轻链的可变结构域通过柔性肽连接形成)和单结构域抗体(sdAbs, 由重链可变区组成)(HAIRUL BAHARA et al., 2013)。抗体库建立后,将噬菌体文库与靶抗原混合,待噬菌体展示的抗体片段与抗原结合后,通过洗涤将未结合或结合能力较弱的噬菌体去除,再将能与靶抗原结合的噬菌体洗脱下来,就得到可与该抗原结合的噬菌体及其抗体基因序列,用于抗体改造(DI NIRO et al., 2010)。

PDT 已被应用于多种 MAbs 的制备,尤其是用于肿瘤治疗的抗体。如被用于治疗转移性默克尔细胞癌的 Avelumab 单抗(BOYERINAS et al., 2015)、用于治疗转移性非小细胞肺癌的 Portrazza 单抗(THATCHER et al., 2015)、用于治疗晚期胃癌或胃食管交界处腺癌的 Cyramza 单抗

(FUCHS et al., 2014) 等。2018 年, PDT 的发明者乔治·史密斯和格雷戈里·温特爵士因其在发明及应用 PDT 中作出的贡献被授予诺贝尔化学奖。PDT 技术筛选周期短, 产量大, 但不能很好表达出抗体的天然构象, 会造成抗体亲和力不高等问题。

1.4.3 核糖体展示技术

核糖体展示最早由 Plückthun 实验室提出, 它是一种无细胞展示系统, 流程主要包括构建模板、体外转录和体外翻译以及亲和筛选 (LIPOVSEK et al., 2004)。在构建模板时, 5'端包括 T7 启动子序列和 SD 序列, 需要去除 3'端的终止密码子。体外表达可以利用 *E.coli* S30 系统、兔网织红细胞裂解液和麦胚提取物的蛋白质合成系统。蛋白翻译后, 由于 3'端没有终止密码子, mRNA 和蛋白会同时结合在核糖体上, 以非共价键的形式结合形成三元复合物。亲和筛选包括固相和液相筛选, 通过抗原-抗体特异性反应, 筛选出相应的 PRM 三元复合物, 然后使用 EDTA 将 mRNA 洗脱下来, RT-PCR 扩增后, 再进行下一轮核糖体展示, 将最后一轮筛选得到的基因与载体连接, 表达单链抗体分子并鉴定其活性 (李琦 等, 2008)。

核糖体展示技术具有建库简单、筛选方法简便等优点, 但目前也存在众多缺陷, 如何增强三元复合物的稳定性、防止 mRNA 被降解和提高展示效率, 仍是待解决的问题。

1.4.4 单个 B 细胞抗体技术

单个 B 细胞抗体技术是近年兴起的一种快速制备 MAbs 的方法, 它利用了每个 B 细胞仅包含一对 VH 和 VL 基因、仅生成一种抗体的特点, 运用单细胞 PCR 技术, 从单个特异性 B 细胞中扩增出抗体 VH 和 VL 基因并连接至表达载体, 最终获得具有生物活性的 MAbs。

单个 B 细胞抗体技术需要先从 B 细胞库中分离抗原特异性 B 细胞, 包括骨髓、淋巴组织、脾脏和外周血, 一般常从脾脏和外周血中分离, 外周血 PBMCs 可通过密度梯度离心进行分离, 脾脏中 PBMCs 需研磨后再进行密度梯度离心。其分选方法包括显微操作法、激光捕获显微切割法 (LCM)、荧光激活细胞分离 (FACS)、溶血斑块技术等方法, 目前常用 FACS 来进行特异性 B 细胞分选, 它最大的优点是可以根据不同的细胞表面标志物, 将不同类型、不同生长阶段的细胞进行区分, 具有很高的灵活性, 已被成功用于针对 O 型 FMDV 的牛源 MAbs、针对 PRRSV 的猪源 MAbs 的制备 (王省, 2019; 魏德陇, 2021)。

得到特异性 B 细胞后, 提取 RNA 并反转录。由于单个 B 细胞的 RNA 量很少, 且 RNA 易被降解, 通过 Trizol 法和 RNA 提取试剂盒来进行 RNA 的提取是不可行的。通常直接将单个的 B 细胞分选至含有裂解液和 RNA 酶抑制剂的孔中, 在超净工作台中于冰上进行操作, 尽可能避免 RNA 的污染及降解。随后进行单个 B 细胞 VH 和 VL 的扩增、测序及分析, 为了避免非特异性扩增, 一般使用套式 PCR (WANG et al., 2000)。由于可变区基因是未知的序列, 对扩增引物的要求很高, 在设计引物时, 根据抗体可变区的前导区设计正向引物, 根据抗体的恒定区设计反向引物。有研究对大量 C57BL/6 小鼠的可变区基因进行分析并设计引物, 该引物可对所有成熟或分化阶段的 B 细胞抗体可变区进行高效、精准的扩增 (TILLER et al., 2009); Wang 等人根据人抗体前导序列和恒定区设计第一轮 PCR 引物, 根据抗体框架区和恒定区设计第二轮 PCR 引物, 通过套式 PCR 成功扩增了人抗体可变区基因, 为重组抗体的制备奠定了基础 (WANG et al.,

2000)。

对 PCR 扩增产物测序获得序列信息后, 可在 IMGT 和 NCBI 网站进行分析, 得到 VH 和 VL 基因序列, 并将其克隆至相应的表达载体中。载体需包括启动子、前导序列、重链和轻链的恒定区、多聚 A 尾等必需组件, 随后在细菌系统或哺乳动物细胞中进行重组抗体的表达。相较而言, 哺乳动物细胞表达系统对于抗体的加工修饰具有显著优势, 因此其表达产物的生物活性更加可靠, 常用的哺乳动物细胞系包括 HEK293 和 CHO 等。经过鉴定后, 最终获得具有生物活性的 MAbs (ADLER et al., 2018)。

单个 B 细胞技术能够最完整地反应出天然的抗原与抗体的相互作用, 通过该技术能够制备出识别天然抗原决定簇的抗体, 且保持抗体重链与轻链的天然配对组合。此外, 单个 B 细胞抗体技术也能够极大地缩减 MAbs 制备所需的时间。近年来, 随着分子细胞生物学的发展, 单个 B 细胞抗体制备技术在病原微生物感染治疗和自身免疫性疾病研究等方面得到广泛应用。在病原微生物感染治疗中, 单个 B 细胞技术已被用于制备针对病原微生物的人源抗体, 如 HIV、流感、登革热、MERS-CoV、SARS-Cov-2 等病原微生物抗体的制备 (GILBERT et al., 2011; LIAO et al., 2009; TAJIRI et al., 2010; ZOST et al., 2020)。Carbonetti 等人通过 FACS 分离来自免疫小鼠的特定抗原结合脾 B 细胞, 与能分泌 CD40L 的细胞共培养以诱导细胞增殖和 MAbs 产生, ELISA 筛选阳性的细胞孔分离 RNA 和逆转录, 最终获得了 11 种针对不同种类疟原虫的重组 MAbs (CARBONETTI et al., 2017); Cox 等通过 FACS 用生物素化的登革热包膜蛋白富集了特异性 B 细胞, 并成功分离出 8 种登革热包膜特异性中和抗体 (COX et al., 2016); Wrammert 等利用从特异性 IgG B 细胞中扩增出的免疫球蛋白可变区, 生产了 50 种以上高亲和力抗流感病毒的人 MAbs (WRAMMERT et al., 2008); Akira 等人从黑色素瘤患者的外周血中分离 PBMCs, 通过单个 B 细胞 RT-PCR 和抗体基因克隆后, 成功制备出抗巨细胞病毒 (CMV) pp65 蛋白的特异性人源 MAbs (IIZUKA et al., 2011)。在自身免疫性疾病研究中, 单个 B 细胞技术也发挥着重要的作用。B 淋巴细胞刺激因子 (BAFF) 是肿瘤坏死因子超家族成员之一, BAFF 的缺陷或异常表达均能引起机体免疫系统的失调, 进而诱导一些自身免疫性疾病的发生 (ZHOU et al., 2009)。有研究以小鼠抗人 BAFF 的杂交瘤细胞为基础, 进一步扩增该抗体的 VH 和 VL 基因序列并测序分析, 不仅为制备特异性抗 BAFF 分子基因工程抗体奠定了坚实基础, 同时也为开发设计新的针对自身免疫性疾病的治疗药物提供了宝贵的理论依据 (肖黎明 等, 2012)。

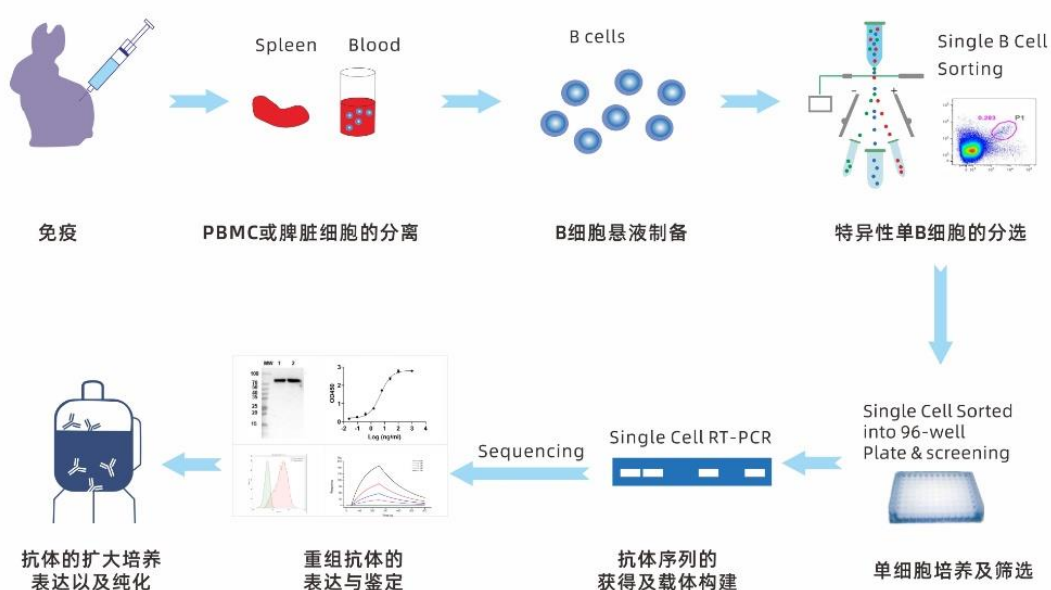


图 1-1 单个 B 细胞抗体制备技术流程图

Fig 1-1 Flowchart of single B cell antibody preparation technique

1.5 研究目的及意义

ASFV 感染性强、致病力高，猪只一旦受到 ASFV 的感染，便会立刻发病，并且迅速在猪群传播。但是目前安全、有效的 ASF 疫苗尚未问世，也无有效的药物可以用于 ASF 的治疗。控制该疾病最为有效的手段是实施“拔牙式”根除策略，这要求我们采用高精确度的检测技术，确保能迅速识别并尽早隔离那些病猪以及疑似病例，从而防止疾病的进一步传播和扩散。

本课题主要包括两个方面内容：（1）利用杂交瘤技术制备针对 ASFV p30 和 p54 蛋白的 MAb；（2）构建重组抗体表达系统。本研究旨制备抗 ASFV p30 和 p54 蛋白的 MAb，并通过重组抗体表达系统将得到的抗体进行更好的保存，为 ASF 的快速诊断方法研发和基础研究提供生物材料。

第二章 鼠抗 ASFV p30 和 p54 单克隆抗体的制备

2.1 实验材料

2.1.1 细胞、病毒、质粒及实验动物

细胞：人胚胎肾细胞（HEK293T）、小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）为本实验室保存；猪肺泡巨噬细胞（PAMs）分离自 30 日龄 SPF 猪。

病毒：ASFV Pig/HLJ/18 株由哈尔滨兽医研究所分离并保存。

质粒：真核表达质粒 pCAGGS-Flag-E183L 和 pCAGGS-Flag-CP204L 由本实验室保存。

实验动物：5 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠购自辽宁长生公司。

2.1.2 主要试剂

Nde I、*Xho* I 限制性内切酶购自 NEB 公司；同源重组试剂盒购自 Vazyme 公司；HisTrap HP 亲和层析柱购自 GE 公司；胎牛血清购自 CLARK 公司；DMEM 培养基、1640 培养基、弗氏佐剂、PEG、HAT、HT、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG（H+L）、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司；蛋白酶抑制剂 PMSF 购自北京索莱宝科技有限公司；TMB 显色液、小鼠单抗亚型鉴定用 ELISA 试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

2.1.3 主要溶液与配方

表 2-1 溶液配置方法

Table 2-1 Solution configuration method		
溶液	组分	操作
Binding buffer	2.4228 g Tris、8.766 g NaCl	800 mL 超纯水充分溶解，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L
Elution buffer	2.4228 g Tris、8.766 g NaCl、68.08 g 咪唑	800 mL 超纯水充分溶解，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L
5×蛋白上样缓冲液	1.25 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.5 g SDS、25 mg BPB、2.5 mL 甘油	加入超纯水后，定容至 5 mL，分装保存，使用前加入 2-Me
考马斯亮蓝染色液	1 g 考马斯亮蓝 R-250、250 mL 异丙醇、100 mL 冰醋酸	加入 650 mL 超纯水，混匀
考马斯亮蓝脱色液	50 mL 无水乙醇、100 mL 冰醋酸	定容至 1 L

表 2-1 (续)

Table 2-1 (continue)

溶液	组分	操作
碳酸盐抗原包被液	1.59 g Na ₂ CO ₃ 、2.93 g NaHCO ₃	800 mL 超纯水充分溶解, 调节 pH 至 9.6, 定容至 1 L
PBST	0.27 g KH ₂ PO ₄ 、1.42 g Na ₂ HPO ₄ 、8 g NaCl、0.2 g KCl、1 mL 吐温	800 mL 超纯水充分溶解, 调节 pH 至 7.4, 定容至 1 L
PEI	0.05 g PEI 粉末	50 mL 双蒸水中溶解, 调节 PH 至 7.0, 使用 0.22 μM 滤膜过滤
1 M Tris-HCl 溶液	121.14 g Tris	加入 1 L 超纯水中, 充分溶解并调节 PH 至 7.4
0.5 M EDTA 溶液	14.61 g EDTA	加入 100 mL 超纯水中, 充分溶解并调节 PH 至 8.0
5 M NaCl 溶液	29.22 g NaCl	加入 100 mL 超纯水中
2 M MgCl ₂ 溶液	19.04 g MgCl ₂	加入 100 mL 超纯水中
Triton X-100 细胞裂解液	50 mL 1 M Tris-HCl、2 mL 0.5 M EDTA、30 mL 5 M NaCl、2.5 mL 2 M MgCl ₂ 、10% 的甘油、1% Triton X-100	加入超纯水充分溶解并定容至 1 L
HAT 培养基	450 mL DMEM 基础培养基、50 mL 胎牛血清、10 mL 双抗、5 mL HAT 储存液 (100×)	混匀
HT 培养基	450 mL DMEM 基础培养基、50 mL 胎牛血清、10 mL 双抗、5 mL HT 储存液 (100×)	混匀

2.2 实验方法

2.2.1 pET-21a-CP204L、pET-21a-E183L 重组质粒的构建

以真核表达质粒 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 为模板, 去除 p30 蛋白 N 端前 100 个氨基酸的疏水区, 去除 p54 蛋白 N 端前 53 个氨基酸的疏水区, 设计引物将 *CP204L* 基因 (QBH90581.1)、*E183L* 基因 (MK333180) 分别扩增并连接至 pET-21a (+) 载体中。

表 2-2 ASFV CP204L 和 E183L 基因 PCR 扩增引物

Table 2-2 PCR amplification primer of ASFV CP204L and E183L gene	
名称	序列(5'-3')
CP204L-F	GAAGGAGATATACATATGTCAGAAAATATACACGAG
CP204L-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCTTCTTCTTCAGCAA
E183L-F	TAAGAAGGAGATATACATATGTCAAGTAGGAAGAAA
E183L-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCAGGCTGTTTTCCAG

2.2.2 pET-21a-CP204L、pET-21a-E183L 重组质粒的原核表达

将重组质粒 pET-21a-CP204L 和 pET-21a-E183L 转化至 *E.coli* BL21 感受态细胞中，挑取单克隆菌落加入 LB 液体培养基中，OD_{600nm} 为 0.6-0.8 时，加入 IPTG，16℃、220 r/min 培养 16-20 h 后，收集菌体沉淀，超声破碎后，分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

2.2.3 p30、p54 重组蛋白的纯化

- (1) 将保存的菌液按 2.2.2 步骤操作，超声破碎后，收集上清并使用 0.22 μm 滤器过滤；
- (2) 启动 AKTA 蛋白纯化系统，使用去离子水清洗仪器管道；
- (3) 将 A1 管道放入 Binding buffer，B1 管道放入 Elution buffer 中。调节设置参数为 System flow: 2 mL/min; Gradient: 0%; 将 HisTrap HP 柱装到柱位阀 3 上，继续运行 5 min;
- (4) 将 A1 管道放入上清样品中，参数不变，继续运行至上清样品上样完毕；
- (5) 将 A1 管道放入 Binding buffer 中，运行至 UV 和 Cond 曲线平缓；
- (6) 使用不同浓度咪唑进行洗脱，调节设置参数 Gradient 分别为 2%，5%，10%，20%，40%和 100%。每次 UV 曲线出现峰时，设置参数 Fraction: 4 mL，收集洗脱液。
- (7) 取部分洗脱液加入 5×蛋白上样缓冲液，100℃煮样 10 min，进行 SDS-PAGE，根据跑胶结果，使用截留分子量为 10 kDa 的超滤管浓缩蛋白，并使用 PBS 进行置换，分装保存至 -80℃。

2.2.4 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

取 15 μL 样品加到上样孔中，80 V 恒压 30 min 后，调节为 120 V 恒压 1 h；小心将胶取下，放入考马斯亮蓝染色液中，待煮沸后，将其置于摇床上摇动 15 min 以充分染色；完成染色后，回收染色液并替换为脱色液，再次煮沸，在摇床上摇动 10 min，此步骤需重复 3 次以上确保充分脱色；对处理完毕后的凝胶进行拍照并分析结果。

2.2.5 纯化重组蛋白的 Western blotting 检测

- (1) 跑胶：取 15 μL 样品加到上样孔中，80 V 恒压 30 min 后，调节为 120 V 恒压 1 h；
- (2) 转膜：使用甲醇活化 PVDF 膜，将 PVDF 膜覆于蛋白胶上，两侧加上薄滤纸和厚滤纸后放入转膜夹，250 mA 恒流转印 1 h。
- (3) 封闭：将膜放入 5%脱脂奶粉中，摇床上摇 1 h；

- (4) 孵育一抗：以鼠源 his 抗体 (1:1000) 为一抗，4℃ 过夜孵育，TBST 洗涤 3 次；
- (5) 孵育二抗：加入相应二抗，常温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次；
- (6) 使用近红外荧光扫描成像系统观察结果。

2.2.6 动物免疫及采血

将纯化后的 p30、p54 蛋白与免疫 BALB/c 小鼠 (150 µg/只)，每次免疫间隔 14 d。三免 7 d 后对小鼠进行采血。

2.2.7 间接 ELISA 检测小鼠血清效价

- (1) 包被：将重组 p30、p54 蛋白使用碳酸盐抗原包被液稀释至 1.5 µg/mL 包被酶标板，4℃ 过夜包被；
- (2) 洗涤：使用 PBST 洗涤 3 次，200 µL/孔，拍干；
- (3) 封闭：加入 5% 脱脂乳，100 µL/孔，37℃ 封闭 2 h，洗涤 3 次；
- (4) 孵育一抗：以不同稀释比例的小鼠血清作为一抗，并设置阴性、阳性对照，37℃ 孵育 1 h，洗涤 3 次；
- (5) 孵育二抗：100 µL/孔，37℃ 孵育 1 h，洗涤 3 次；
- (6) 显色：100 µL/孔显色液，避光孵育 10 min；
- (7) 终止：50 µL/孔终止液，立即测定 OD_{450nm} 值。

2.2.8 细胞融合

(1) 脾细胞的准备

- ① 提前 3-5 d 将计划进行细胞融合的小鼠加强免疫；
- ② 将小鼠通过颈部脱位法进行处死，腹部朝上固定在解剖板上；
- ③ 使用无菌剪小心剪开小鼠左侧皮肤，然后更换剪刀镊子，剪开小鼠左侧腹部肌肉，取出脾脏；
- ④ 将脾脏放入含有 10 mL 无血清的 DMEM 培养基中，轻轻洗涤，剥离多余的结缔组织；
- ⑤ 将脾脏放入细胞筛中，再将细胞筛放入无血清 DMEM 培养基中，研磨脾脏直至脾脏变透明，取少量悬液进行细胞计数。

(2) 细胞融合

- ① 将 SP2/0 细胞和脾细胞按 1:10 的比例混合，1000 r/min 离心 10 min；
- ② 尽可能将上清全部弃除，轻轻拍打细胞，使细胞变松散；
- ③ 在 42℃ 水浴条件下，向细胞中匀速加入 1 mL 预热的 PEG，1 min 加完，静置 1 min；
- ④ 匀速加入 1 mL 无血清 DMEM 培养基，1 min 加完，匀速加入 2 mL 无血清 DMEM 培养基，1 min 加完，匀速加入 3 mL 无血清 DMEM 培养基，1 min 加完，匀速加入 14 mL 无血清 DMEM 培养基，2 min 内加完；
- ⑤ 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，重悬细胞，混匀后铺于 96 孔板中；
- ⑥ 将细胞置于 37℃，5% CO₂ 细胞培养箱中培养，7 d 后半换液。

2.2.9 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

(1) 筛选: 使用间接 ELISA 方法进行筛选, 取出 100 μL 细胞上清作为一抗, 其余步骤同方法 2.2.7;

(2) 亚克隆: 挑选 ELISA 结果较好的阳性杂交瘤细胞孔, 稀释至约 100 个细胞/10 mL, 混匀后铺于 96 孔板中, 37°C, 5% CO_2 细胞培养箱中培养;

(3) 重复亚克隆 2-4 次。

2.2.10 腹水制备

选用 10 周龄 BALB/c 小鼠, 腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂。7 d 后, 腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。注射后的 7 至 15 d 内, 密切观察小鼠腹部变化, 当腹部出现显著膨大时, 随即进行腹水抽取并进行纯化处理。

2.2.11 Western blotting 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

使用 PEI 将 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 真核表达质粒转染 HEK293T 细胞, 24 h 后收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液冰上裂解 30 min, 离心后收集上清制样。分别以制备的 MAb (1:1000)、鼠抗 Flag 抗体 (1:1000)、鼠抗 GAPDH 抗体 (1:5000) 为一抗, 进行 Western blotting 鉴定。其余操作同步骤 2.2.5。

2.2.12 Western blotting 鉴定 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 ASFV Pig/HLJ/18 以 1 MOI 感染 PAMs, 24 h 后收集细胞沉淀, 用含有 1% Triton X-100 的细胞裂解液进行裂解, 离心后收集上清制样。分别以制备的 MAb (1:1000)、鼠抗 GAPDH 抗体 (1:5000) 为一抗, 进行 Western blotting 鉴定。其余操作同步骤 2.2.5。

2.2.13 IFA 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

(1) 包板: 48 孔板每孔加入 200 μL 多聚赖氨酸, 37°C 孵育 1 h, PBS 洗 3 遍;

(2) 转染: 使用 PEI 将 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 真核表达质粒转染 HEK293T 细胞, 每孔转染 250 ng 质粒, 37°C, 5% CO_2 培养箱中 24 h;

(3) 固定: 弃去细胞培养上清, PBS 洗 3 遍, 加入 200 μL 组织细胞固定液, 4°C 30 min, PBS 洗 3 遍;

(4) 透膜: 每孔加入 200 μL 0.3% Triton X-100, 常温孵育 15 min, PBS 洗 3 遍;

(5) 封闭: 每孔加入 200 μL 10% FBS, 常温孵育 30 min, PBS 洗 3 遍;

(6) 孵育一抗: 分别以制备的 MAb (1:1000)、鼠抗 Flag 抗体 (1:1000) 为一抗, 常温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍;

(7) 孵育二抗: 加入二抗, 常温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍;

(8) 观察: 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.14 IFA 鉴定 MAbs 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 ASFV Pig/HLJ/18 以 1 MOI 感染 PAMs，培养 24 h 后处理细胞，其余操作同步骤 2.2.13。

2.2.15 MAbs 亚类鉴定

按照小鼠单抗亚类鉴定 ELISA 试剂盒进行。

2.2.16 MAbs 抗原表位鉴定

对 *E183L* 基因进行逐步截短，连接至 pGEX-6P-1 载体，转化至 *E.coli* BL21 感受态细胞中诱导表达。以抗 p54 蛋白 MAbs (1:1000) 和鼠源 GST 抗体 (1:1000) 为一抗，进行 Western blotting 鉴定，以确定抗 p54 蛋白 MAbs 识别的抗原表位区域。

2.3 结果

2.3.1 p30 和 p54 重组蛋白的原核表达

分别将 pET-21a-CP204L/BL21 和 pET-21a-E183L/BL21 重组菌进行诱导表达，16℃诱导 16 h 后收取菌体沉淀，超声破碎后进行 SDS-PAGE。结果显示 IPTG 诱导的含 pET-21a-CP204L 质粒和 pET-21a-E183L 质粒的重组菌样品分别出现大小约 15 kDa 和 17 kDa 的蛋白条带（图 2-1），与预期大小相符。且两者均以可溶的形式表达在上清中，而未诱导的菌液中未检测到目的蛋白条带。

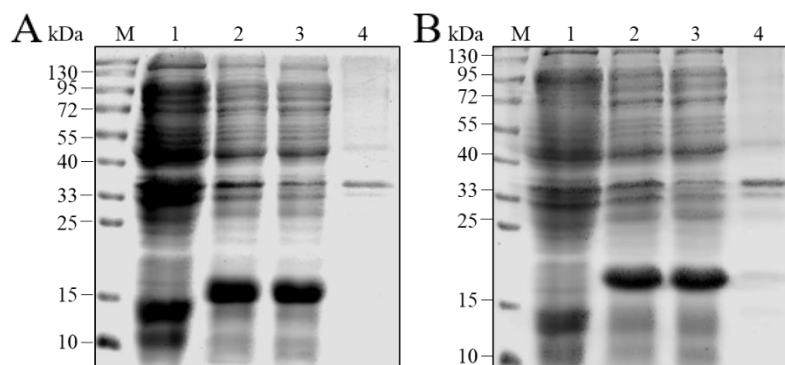


图 2-1 原核表达的 p30 和 p54 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig 2-1. Detection of p30 and p54 recombinant proteins expressed in prokaryotic cells by SDS-PAGE

A: p30 重组蛋白的表达; B: p54 重组蛋白的表达。

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未经 IPTG 诱导含重组质粒的裂解液; 2: 经 IPTG 诱导含重组质粒的细菌裂解液; 3: 经 IPTG 诱导含重组质粒的细菌裂解液的上清; 4: 经 IPTG 诱导含重组质粒的细菌裂解液的沉淀

A: Expression of p30 recombinant protein; B: Expression of p54 recombinant protein.

M: Marker; 1: Recombinant bacteria lysate containing recombinant plasmid without IPTG induction; 2: Recombinant

bacteria lysate containing recombinant plasmid induced by IPTG; 3: Recombinant bacteria lysate supernatant containing recombinant plasmid induced by IPTG; 4: Recombinant bacteria lysate precipitation containing recombinant plasmid induced by IPTG.

2.3.2 p30 和 p54 重组蛋白的纯化和鉴定

使用 Ni^{2+} 柱对 p30 和 p54 重组蛋白进行纯化，纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。SDS-PAGE 结果显示，纯化后分别获得单一的大小约 15 kDa、17 kDa 的蛋白条带，与预计的 p30、p54 重组蛋白大小相符（图 2-2 A 和 C）；进一步进行 Western blotting 检测，利用 His 抗体分别能在约 15 kDa、17 kDa 处检测到特异性条带，表明成功纯化得到了高纯度的 p30、p54 重组蛋白（图 2-2 B 和 D）。

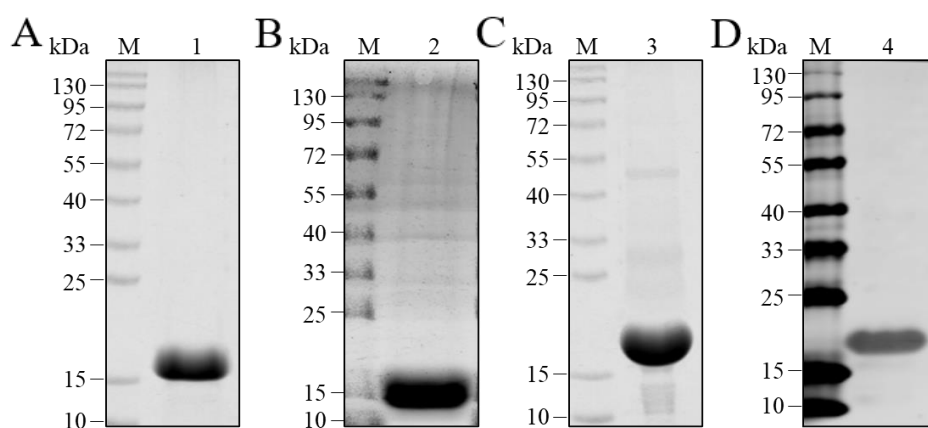


图 2-2 纯化的 p30 和 p54 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定

Fig 2-2. Identification of purified p30 and p54 recombinant proteins by SDS-PAGE and Western blotting

A: SDS-PAGE 鉴定纯化的 p30 蛋白; B: Western blotting 鉴定纯化的 p30 蛋白; C: SDS-PAGE 鉴定纯化的 p54 蛋白; D: Western blotting 鉴定纯化的 p54 蛋白。

M: 蛋白质分子质量标准; 1-2: 纯化的 p30 蛋白; 3-4: 纯化的 p54 蛋白。

A: SDS-PAGE identification of purified p30 protein; B: Western blotting identification of purified p30 protein; C: SDS-PAGE identification of purified p54 protein; D: Western blotting identification of purified p54 protein.

M: Protein molecular weight standard; 1-2: Purified p30 protein; 3-4: Purified p54 protein.

2.3.3 免疫小鼠血清效价检测

分别使用纯化的 p30、p54 蛋白免疫小鼠，三免后 7 d 采血，通过间接 ELISA 方法测定血清效价。ELISA 结果显示，免疫小鼠血清效价均高于 1:51200，可以进行细胞融合（图 2-3）。经过细胞融合和筛选，最终得到 3 株分泌抗 p30 蛋白抗体和 1 株分泌抗 p54 蛋白抗体的杂交瘤细胞株，接下来挑选了效果最好的杂交瘤细胞进行进一步的研究。

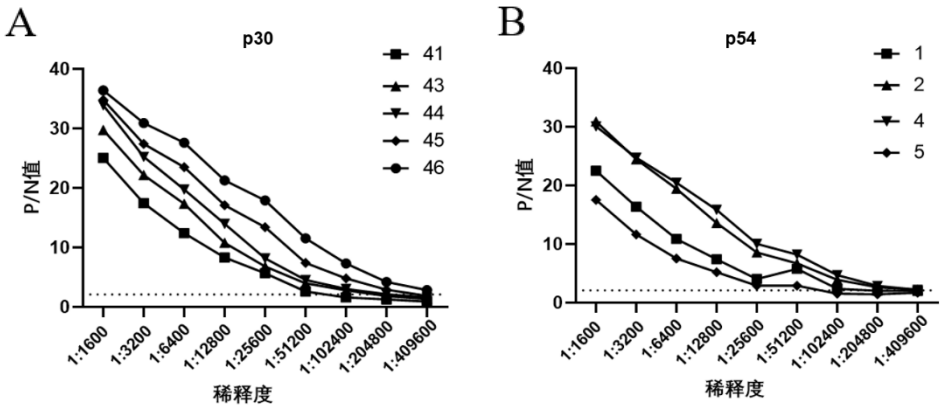


图 2-3 p30 和 p54 蛋白免疫小鼠的血清效价

Fig 2-3. Serum titer of mice immunized by p30 and p54

A: p30 蛋白免疫小鼠的血清效价；B: p54 蛋白免疫小鼠的血清效价。

A: Serum titer of mice immunized by p30 protein; B: Serum titer of mice immunized by p54 protein.

2.3.4 Western blotting 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将表达 p30 和 p54 蛋白的真核表达质粒分别转染 HEK293T 细胞，24 h 后收集细胞并制样，以制备的抗 p30、抗 p54 MAb 为一抗进行 Western blotting 检测。结果显示，分别能在 30 kDa、25 kDa 处检测到特异性条带，与 p30、p54 蛋白大小符合（图 2-4），表明 MAb 可以特异性识别 HEK293T 细胞中外源表达的 p30、p54 蛋白。

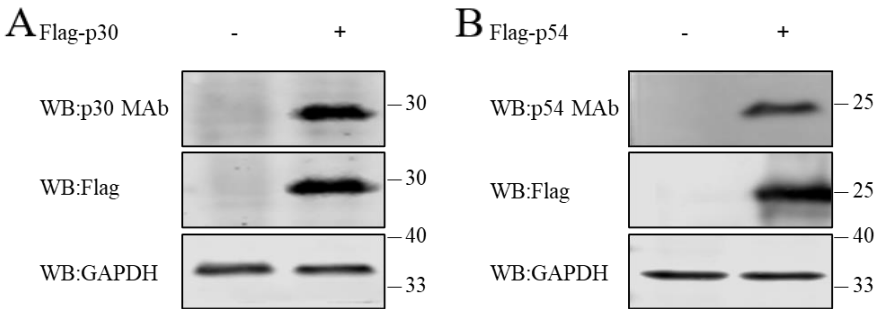


图 2-4 Western blotting 鉴定 MAb 与外源表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

Fig 2-4. Western blotting identification of reactivity of monoclonal antibody with p30 and p54 proteins expressed in HEK293T cells

A: Western blotting 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p30 的表达；B: Western blotting 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p54 的表达。

A: Western blotting detection of the over-expressed Flag-p30 in HEK293T cells; B: Western blotting detection of the

over-expressed Flag-p54 in HEK293T cells.

2.3.5 Western blotting 鉴定 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 ASFV Pig/HLJ/18 感染 PAMs (MOI=1), 以制备的抗 p30、抗 p54 MAb 为一抗进行 Western blotting 检测。结果显示, 分别能够在 30 kDa、25 kDa 处检测到特异性条带, 与 p30、p54 蛋白大小符合 (图 2-5), 表明制备的 MAb 可以特异性识别 ASFV 感染的 PAMs 中表达的 p30、p54 蛋白。

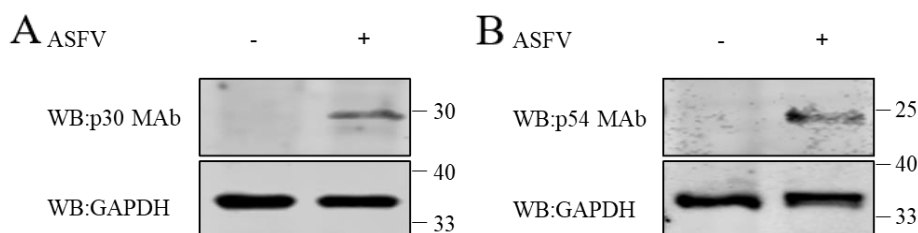


图 2-5 Western blotting 鉴定 MAb 与 ASFV 感染的 PAMs 中表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

Fig 2-5. Western blotting identification of monoclonal antibody reactivity with p30 and p54 proteins in ASFV-infected PAMs

A: Western blotting 检测 ASFV 感染 PAMs 细胞中 p30 的表达; B: Western blotting 检测 ASFV 感染 PAMs 细胞中 p54 的表达。

A: Western blotting detection of the expression of p30 in ASFV-infected PAMs; B: Western blotting detection of the expression of p54 in ASFV-infected PAMs.

2.3.6 IFA 鉴定 MAb 与过表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将真核表达质粒 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 分别转染 HEK293T 细胞, 24 h 后, 固定细胞, 分别以制备的抗 p30、抗 p54 MAb 和鼠抗 Flag 抗体为一抗进行 IFA 检测。结果显示, 使用抗 p30、抗 p54 MAb 和鼠抗 Flag 抗体孵育孔呈现特异性的绿色荧光, 而阴性对照组未观察到绿色荧光 (图 2-6), 表明 MAb 可以特异性识别 HEK293T 细胞中外源表达的 p30、p54 蛋白。

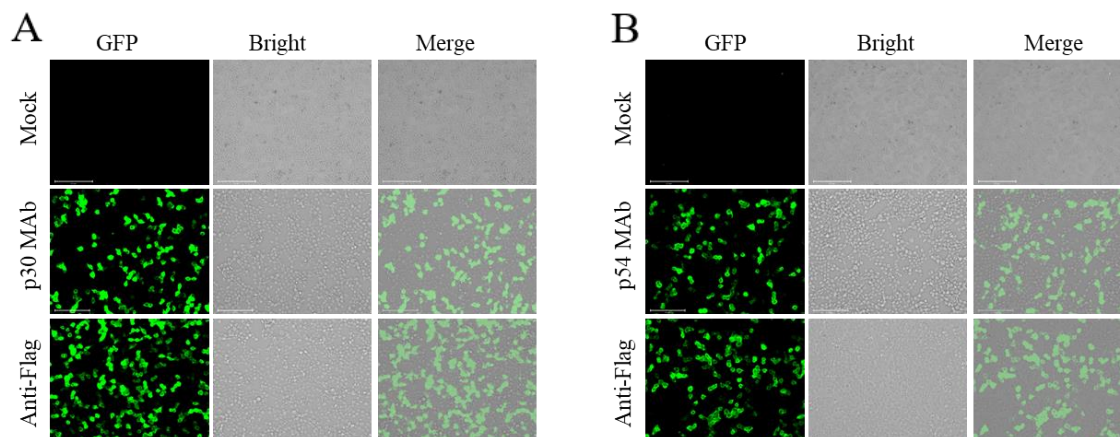


图 2-6 IFA 鉴定 MAb 与外源表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

Fig 2-6. IFA identification of monoclonal antibody reactivity with p30 and p54 proteins expressed in HEK293T cells

A: IFA 检测转染 pCAGGS-Flag-CP204L 质粒的 HEK293T 细胞中 Flag-p30 的表达; B: IFA 检测转染 pCAGGS-Flag-E183L 质粒的 HEK293T 细胞中 Flag-p54 的表达。

A: IFA detection of Flag-p30 over-expressed in HEK293T cells; B: IFA detection of Flag-p54 over-expressed in HEK293T cells.

2.3.7 IFA 鉴定 p30 和 p54 MAb 与 ASFV 表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 ASFV Pig/HLJ/18 感染 PAMs (MOI=1), 以制备的抗 p30、抗 p54 MAb 和 ASFV 阴性血清为一抗进行 IFA 检测。结果显示, 使用抗 p30、抗 p54 MAb 孵育孔呈现特异性的绿色荧光, 而阴性对照组未观察到绿色荧光 (图 2-7), 表明制备的 MAb 可以特异性识别 ASFV 感染后 PAMs 中内源表达的 p30、p54 蛋白。

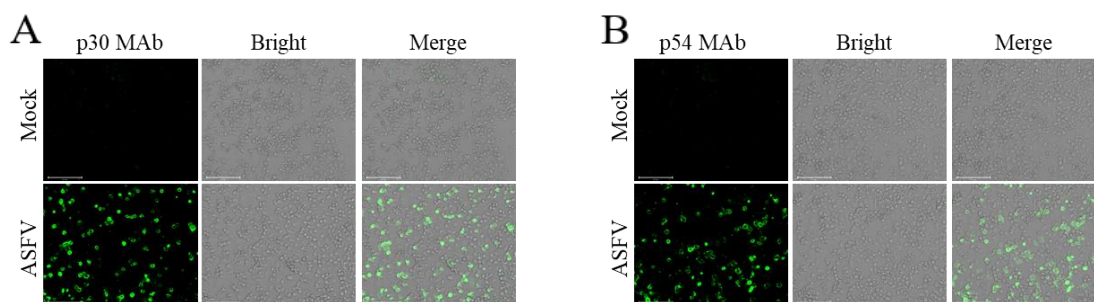


图 2-7 IFA 鉴定 MAb 与 ASFV 感染的 PAMs 中表达的 p30 和 p54 蛋白的反应性

Fig 2-7. IFA identification of monoclonal antibody reactivity with p30 and p54 proteins expressed in ASFV-infected PAMs

A: IFA 检测 ASFV 感染 PAMs 细胞中 p30 的表达; B: IFA 检测 ASFV 感染 PAMs 细胞中 p54 的表达。

A: IFA detection of the expression of p30 in ASFV-infected PAMs; B: IFA detection of the expression of p54 in ASFV-infected PAMs.

2.3.8 MAb 亚类鉴定

使用 MAb 亚类鉴定试剂盒分别对抗 p30、抗 p54 MAb 培养上清进行检测, ELISA 结果显示, 抗 p30 MAb 的重链类型为 IgM, 轻链类型为 κ 链; 抗 p54 MAb 的重链类型为 IgG1, 轻链类

型为 κ 链（图 2-8）。

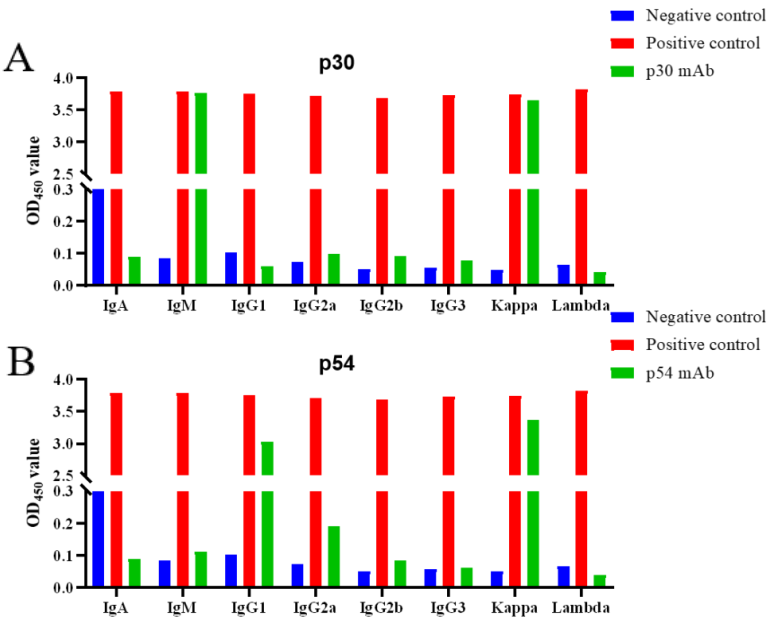


图 2-8 MAb 亚类鉴定

Fig 2-8. Identification of monoclonal antibody subtype

A: 抗 p30 MAb 亚类鉴定；B: 抗 p54 MAb 亚类鉴定。

A: Identification of subtype of anti-p30 monoclonal antibody; B: Identification of subtype of anti-p54 monoclonal antibody.

2.3.9 抗 p54 蛋白 MAb 抗原表位鉴定

分别构建 ASFV Pig/HLJ/18 p54 蛋白截短蛋白 D1（54-183 aa）、D2（101-183 aa）和 D3（151-183 aa），western blot 结果显示，该株 MAb 可与 D1 片段特异性结合，而不与片段 D2 及 D3 结合，表明该 MAb 抗原表位位于 54-100aa 之间；再将此区域进行进一步截短为 D4（54-100 aa）、D5（54-70 aa）、D6（54-90 aa）、D7（91-100 aa）、D8（71-100 aa），结果显示本研究制备的 MAb 能够分别与片段 D4、D6 及 D8 特异性结合，而不与其他片段结合，表明该 MAb 抗原表位位于三个片段的重叠区域，即 71-90 aa；再将此重叠片段进行截短，结果显示该 MAb 识别的表位为 80-90aa，氨基酸序列为⁸⁰VTPQPGTSKPA⁹⁰（图 2-9）。

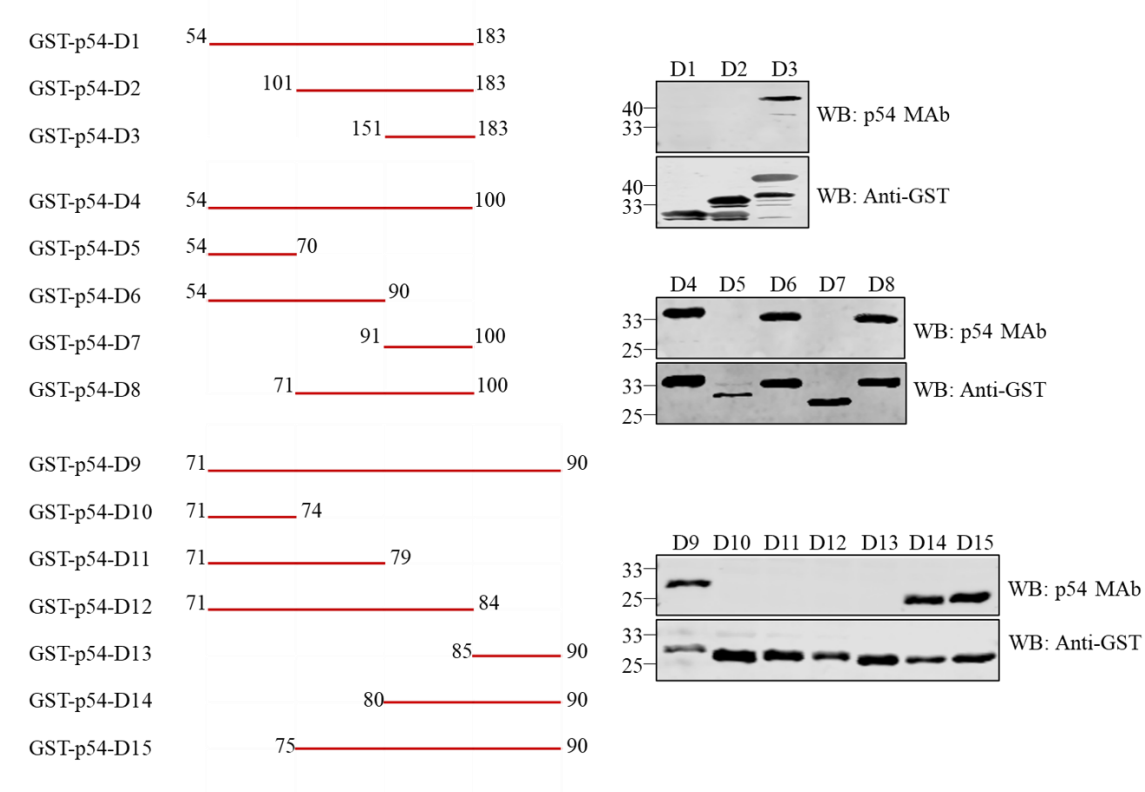


图 2-9 抗 p54 蛋白 MAb 识别的抗原表位的 Western blot 鉴定

Fig 2-9. Identification of antigenic epitopes recognized by anti-p54 MAb by Western blotting

2.4 讨论

蛋白表达系统主要包括原核表达系统、杆状病毒-昆虫表达系统和哺乳动物表达系统。其中原核表达系统因培养条件简单、培养周期短、表达水平高等优势，被广泛用作重组蛋白质的表达（苗朝悦 等, 2023）。与包涵体表达的蛋白相比，可溶性的蛋白更接近天然蛋白结构，也更易于纯化（魏天 等, 2022）。本研究去除了 p30 蛋白 N 端前 100 个氨基酸、p54 蛋白 N 端前 53 个氨基酸的疏水区，使用大肠杆菌表达系统成功表达了可溶性的 p30 和 p54 重组蛋白，经纯化获得了高纯度的 p30 和 p54 重组蛋白，经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定，能够在约 15 kDa 和 17 kDa 处检测到特异性条带，表明成功纯化得到重组蛋白。将得到的 p30 和 p54 蛋白免疫小鼠，三免后血清抗体效价都高于 1:51200，表明纯化出的蛋白具有良好的免疫原性。

MAb 特异性强、灵敏度高，对 ASFV 蛋白的功能研究及血清学诊断试剂的研发都至关重要，因此抗 ASFV 蛋白抗体的制备也是当前研究的热点。自 1975 年科勒和米尔斯廷发明了杂交瘤技术后，这一技术已经发展是目前最常用、最成熟的 MAb 制备技术（TOMITA et al., 2011）。有研究使用杂交瘤技术制备了针对 ASFV K205R 蛋白的 MAb，经鉴定该株 MAb 具有良好的反应性和特异性，腹水抗体效价达 1:500000（陈寅龙 等, 2023）；矫健等人使用杂交瘤技术制备了针对 ASFV p22 蛋白的 MAb，获得 2 株 MAb，都具有良好的反应性，ELISA 效价不低于 1:256000（矫健 等, 2023）。本研究以纯化的 p30 和 p54 截短蛋白为抗原免疫小鼠，获得了分别针对 p30 和 p54 蛋白的 MAb，能分别识别 HEK293T 细胞中外源表达及 ASFV 感染的 PAMs 细胞中的 p30 蛋白和 p54 蛋白。抗 p30 MAb 重链类型为 IgM，轻链类型为 κ 链；抗 p54 MAb 重链类型为 IgG1，轻链

类型为 κ 链。抗 p54 蛋白 MAbs 识别的表位为 80-90aa。为 ASFV p30 和 p54 蛋白结构的研究及 ASFV 诊断试剂的研发提供了基本材料。

2.5 小结

1. 成功表达并纯化了截短 p30 和 p54 重组蛋白，经验证蛋白具有良好的抗原性。
2. 成功制备抗 p30 和 p54 蛋白的 MAbs，经验证其均具有良好的反应性和特异性，可用于 WB 和 IFA 试验。抗 p30 MAbs 重链类型为 IgM，轻链类型为 κ 链；抗 p54 MAbs 重链类型为 IgG1，轻链类型为 κ 链；抗 p54 蛋白 MAbs 识别的表位为 80-90 aa。

第三章 重组抗体表达系统构建

3.1 实验材料

3.1.1 细胞、病毒、质粒

细胞：HEK293T 细胞为本实验室保存；PAMs 分离自 30 日龄 SPF 猪。
病毒：ASFV Pig/HLJ/18 株由哈尔滨兽医研究所分离并保存。
质粒：真核表达质粒 pCAGGS-Flag-E183L 和 pCAGGS-Flag-CP204L 由本实验室保存。

3.1.2 主要试剂

三氯甲烷、异丙醇购自 Biosharp 公司；Trizol 购自赛默飞公司；Bio RT 高灵敏 cDNA 第一链合成试剂盒购自 BioFlux 公司；PrimeSTAR Max Premix 购自 TaKaRa 公司；同源重组试剂盒购自 Vazyme 公司；胎牛血清购自 CLARK 公司；Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG（H+L）购自 Sigma 公司；蛋白酶抑制剂 PMSF 购自索莱宝公司；IRDye 800CW 山羊抗鼠 IgG 购自 LICOR 公司。

3.1.3 主要溶液与配方

表 3-1 溶液配置方法

Table 3-1 Solution configuration method		
溶液	组分	操作
5×蛋白上样缓冲液	1.25 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、	加入超纯水后，定容至 5 mL，分装保存，使用前加入 2-Me
	0.5 g SDS、25 mg BPB、2.5 mL 甘油	
PEI	0.05 g PEI 粉末	50 mL 双蒸水中溶解，调节 PH 至 7.0，使用 0.22 μM 滤膜过滤
Triton X-100 细胞裂解液	50 mL 1 M Tris-HCl、2 mL 0.5 M EDTA、30 mL 5 M NaCl、2.5 mL	加入超纯水充分溶解并定容至 1 L
	2 M MgCl ₂ 、10% 的甘油、1% Triton X-100	

3.2 实验方法

3.2.1 单克隆细胞株 RNA 的提取及反转录

- (1) 细胞中加入 600 μL Trizol，室温裂解 10 min；
- (2) 加入 150 μL 三氯甲烷，4℃ 12000 rpm 离心 15 min；

- (3)

加入 200 μ L 异丙醇，吸取 200 μ L 上层液体，混匀，-20℃静置 30 min 以上；
- (4)

4℃ 12000 rpm 离心 15 min，弃上清，注意不要弃走底部沉淀；
- (5)

加入 600 μ L 75%酒精，轻轻旋转离心管，使沉淀脱离底部；
- (6)

4℃ 12000 rpm 离心 15 min，小心弃走上清，静置使剩余液体晾干；
- (7)

晾干后，加入 50 μ L DEPC 水，使沉淀溶解。
- (8)

使用 Bio RT 高灵敏 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录后，-20℃保存。

3.2.2 VH 和 VL 基因的扩增及克隆

引物参照参考文献（吴挺, 2023）。

表 3-2 PCR 反应体系

Table 3-2 The reaction system of PCR	
组分	体积（ μ L）
5× PrimeStar	25
上/下游引物	各 1
模板 DNA	2
ddH ₂ O	21

表 3-3 PCR 反应程序

Table 3-3 The reaction procedure of PCR		
温度	时间	循环
98℃	3 min	
98℃	30 s	35×
55℃	15 s	35×
72℃	30 s	35×
72℃	10 min	

3.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测

配制含 1%琼脂糖凝胶，加入适量核酸染料，完全凝固后即可使用。将上述 PCR 产物加入 10×Loading Buffer 后，加入上样孔，电泳仪 160 V 恒压 15 min。将扩增得到的条带回收，由吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

3.2.4 重组抗体质粒制备

利用 Ig Blast、IMGT 数据库对上述得到的可变区序列进行分析，确定其 VH、VL 所属家族及可变区完整性。将 VH 序列克隆至含有鼠重链恒定区的 pcDNA3.4 载体中，将 VL 序列克隆至含有鼠轻链恒定区的 pcDNA3.4 载体中，获得质粒 pcDNA3.4-CP204L-H、pcDNA3.4-CP204L-L、pcDNA3.4-E183L-H 和 pcDNA3.4-E183L-L。

3.2.5 重组抗体的表达

(1) 铺板：将 HEK293T 细胞铺至 6 孔板中，37°C 5% CO₂ 培养箱培养 12 h；

(2) 转染：将抗体表达质粒 pcDNA3.4-CP204L-H 和 pcDNA3.4-CP204L-L、pcDNA3.4-E183L-H 和 pcDNA3.4-E183L-L，以 1:1 的比例分别共转染至 HEK293T 细胞中；

(3) 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 96 h 后收集细胞上清及裂解液进行 Western blotting 验证。实验方法参考步骤 2.2.5。

3.2.6 重组抗体的鉴定

使用 Western blotting 和 IFA 检测方法对重组抗体的反应性进行鉴定，实验方法参考步骤 2.2.11-2.2.14。

3.3 结果

3.3.1 VH 及 VL 基因 PCR 扩增结果

分别以抗 ASFV p30 和 p54 蛋白单克隆细胞株的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果显示扩增出的片段约为 400 bp，与预期 VH 和 VL 大小相符。

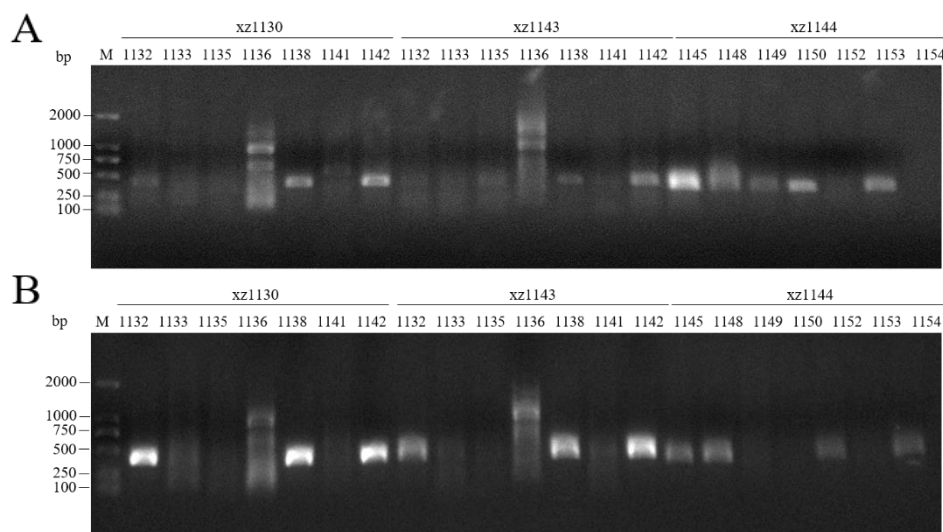


图 3-1 MAb VH 和 VL PCR 扩增结果

Fig 3-1. Amplification of VH and VL genes by PCR

A: 抗 p30 MAb VH 和 VL PCR 扩增结果；B: 抗 p54 MAb VH 和 VL PCR 扩增结果（注：xz1130、1143 为重链上游引物，xz1132、1133、1135、1141、1142 为重链下游引物；xz1144 为轻链上游引物，xz1145、1148-1154 为轻链下游引物）。

A: PCR amplification of VH and VL genes of anti-p30 monoclonal antibody; B: PCR amplification of VH and VL genes of anti-p54 monoclonal antibody (Note: xz1130 and 1143 were upstream primers of VH, and xz1132、1133、1135、1141、1142 were downstream primers of VH; xz1144 were upstream primers of VL, and xz1145、1148-1154 were downstream primers of VL).

3.3.2 VH 及 VL 序列比对及分析

测序得到的 VH 和 VL 的序列结果在 Ig Blast 和 IMGT 网站上进行比对, 确定其核苷酸序列。它们都包含 3 个抗原互补决定区 (CDR) 及 4 个框架区 (FR), 具有完整的可变区结构。

抗 p30 蛋白 MAb VH 全长为 372 bp，编码 123 个氨基酸，其 V 基因类型为 IGHV5-9-3*01，D 基因类型为 IGHD2-4*01 或 IGHD2-9*02，J 基因类型为 IGHJ4*01，CDR3 区的氨基酸序列为 ARLGAYDYDVGYAMDY；VL 全长为 336 bp，编码 112 个氨基酸，其 V 基因类型为 IGKV2-137*01，J 基因类型为 IGKJ1*01，CDR3 区的氨基酸序列为 MQHLEYPWT。抗 p54 蛋白 MAb VH 全长为 351 bp，编码 117 个氨基酸，其 V 基因类型为 IGHV14-1*02，D 基因类型为 IGHD1-1*01 或 IGHD1-2*01，J 基因类型为 IGHJ3*01，CDR3 区的氨基酸序列为 TRSGIRGFAY；VL 全长为 336 bp，编码 112 个氨基酸，其 V 基因类型为 IGKV8-27*01，J 基因类型为 IGKJ1*01，CDR3 区的氨基酸序列为 HOYLSSWT。



图 3-2 抗 p30 蛋白 MAb 可变区序列分析

Fig 3-2. Sequence analysis of variable region of anti-p30 monoclonal antibody

A: VH 基因序列、CDR 区及 FR 区; B: VL 基因序列、CDR 区及 FR 区。

A: gene sequence, CDR region and FR region of VH; B: gene sequence, CDR region and FR region of VL.

A

V	96.3% (283/294)	Query_1 IGHV14-1*02	1	<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM	
			1	E V Q L Q Q S G P E L V R P G A F V Q L S C T A S G F N I K GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTTGTTGAGGCAGGGGCTTTGTCCAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAA	90
V	93.5% (275/294)	IGHV14-3*02	1	G.....A.....A.....A.....	90
V	93.8% (274/292)	IGHV14-4*01	1	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A L V L S C K A S G F N I KG.A.....A.....CA.....A.....	90
			1	G.....G.....CA.....A.....T.....	90
V	96.3% (283/294)	Query_1 IGHV14-1*02	91	GT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----	
			91	D Y Y I H W V K Q R P E Q Q G L E W I G W I D P E N D N T I F GACTACTATATACATGGGTGAAGCAGAGGCTGAACAGGCTCGAGTGATTGGATGGATTGATCCTGAAATGATAATCATATATT	180
V	93.5% (275/294)	IGHV14-3*02	91	G.....G.....G.....G.....A.....	180
V	93.8% (274/292)	IGHV14-4*01	91	D Y Y H W V K Q R P E Q Q G L E W I G W I D P E N G N T I Y ..AC.....G.....A.....G.....G.....A.....A.....	180
			91	G.....G.....G.....G.....GA.....A.....	180
V	96.3% (283/294)	Query_1 IGHV14-1*02	181	-----FR3-IMGT-----	
			181	D P K F Q G K A S I T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S E D GACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCAGTATACAGCAGACACATCTCTCAACACAGCCTACCTGCAACTCAGCAGCTGACATCTGAGGAC	270
V	93.5% (275/294)	IGHV14-3*02	181	G.....	270
V	93.8% (274/292)	IGHV14-4*01	181	D P K F Q G K A S I T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S E DC.....C.....	270
			181	C.....C.....	270
V	96.3% (283/294)	Query_1 IGHV14-1*02	271	-----><-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->	
			271	T A V F Y C T R S G I R G F A Y W G Q G T L V T V S A ACTGCCGTCTTTACTGTACTAGATCCGGGATACGGGGTTTGTCTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCATGTCTCTGCA	351
V	93.5% (275/294)	IGHV14-3*02	271	A.....A.....	294
V	93.8% (274/292)	IGHV14-4*01	271	T A V Y Y C A RA.....G.....	294
D	100.0% (5/5)	IGHD1-1*01	9	A.....	292
D	100.0% (5/5)	IGHD1-2*01	9	A.....	13
J	100.0% (44/44)	IGHJ3*01	4	A.....	47
J	95.5% (42/44)	IGHJ3*02	4	G.....G.....	47
J	100.0% (14/14)	IGHJ2*01	12	G.....G.....	25

B

V	98.7% (296/300)	Query_1 IGKV8-27*01	1	<-----FR1-IMGT-----><-----	
			1	N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M N C K S S Q N V L AACATTATGATGACACAGTGCACATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGAGAAAGGTCTACTATGAATCTGAATCCAGTCAAAATGTTT	90
V	88.9% (257/289)	IGKV8-30*01	2	G.....G.....	90
V	89.8% (254/283)	IGKV8-19*01	2	N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V LG.....T.....T.....C.....C.....A.....A.....T.....G.....T.....G.....C.....G.....GCC.....	90
			2	G.....C.....G.....G.....C.....G.....C.....G.....	90
V	98.7% (296/300)	Query_1 IGKV8-27*01	91	--CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM----->	
			91	Y S S N Q K N Y L A W F Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R TACAGTTCAAATCAGAAGAACTACTTGGCTGGTTCACAGCAGAAACAGGGCAGTCTCTCAAAGCTGTGATCTACTCGGGCATCCTAGG	180
V	88.9% (257/289)	IGKV8-30*01	91	A.....	180
V	88.9% (257/289)	IGKV8-30*01	91	Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R ..T..AGC.....A.....A.....A.....A.....T.....T.....	180
V	89.8% (254/283)	IGKV8-19*01	91	A.....GG.....A.....A.....A.....C.....T.....	180
V	98.7% (296/300)	Query_1 IGKV8-27*01	181	-----FR3-IMGT-----	
			181	E S G V P D R F T G S G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A GAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTACAGGCAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCACAGCAGTGTACAAGCTGAGGACCTGGCA	270
V	88.9% (257/289)	IGKV8-30*01	181	G.....G.....	270
V	89.8% (254/283)	IGKV8-19*01	181	E S G V P D R F T G S G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L AG.....G.....A.....A.....C.....C.....G.....G.....A.....A.....	270
V	98.7% (296/300)	Query_1 IGKV8-27*01	271	-----><-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->	
			271	V Y Y C H Q Y L S S W T F G G G T K L E I K GTTATTACTGTCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTGGTGGAGGACCAAGCTGGAATCAAA	336
V	88.9% (257/289)	IGKV8-30*01	271	G.....	300
V	89.8% (254/283)	IGKV8-19*01	271	V Y Y C H Q Y L S SG.....	290
J	100.0% (36/36)	IGKJ1*01	2	A.....	284
J	100.0% (33/33)	IGKJ1*02	3	A.....	37
J	87.9% (29/33)	IGKJ2*01	6	A.....G.....G.....A.....	35
			3	A.....G.....G.....A.....	38

图 3-3 抗 p54 蛋白 MAb 可变区序列分析

Fig 3-3. Sequence analysis of variable region of anti-p54 monoclonal antibody

A: VH 基因序列、CDR 区及 FR 区; B: VL 基因序列、CDR 区及 FR 区。

A: gene sequence, CDR region and FR region of VH; B: gene sequence, CDR region and FR region of VL.

3.3.3 表达重组抗体的 Western blotting 检测

分别将抗 p30 和 p54 的重链/轻链抗体表达质粒按 1:1 的比例共转染至 HEK293T 细胞中, 分

别收集细胞上清进行 Western blotting，检测抗体表达情况。结果显示，经过变性后，重链大小大约 50 kDa，轻链大小约为 25 kDa，与预期大小相一致，表明成功表达重组抗体（图 3-4）。

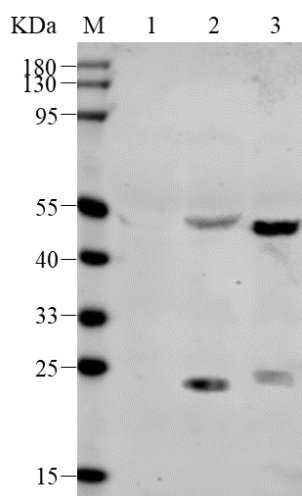


图 3-4 Western blotting 检测重组抗体 VH 和 VL 的表达

Fig 3-4. Detection of the expression of recombinant antibody by Western blotting

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 空白对照; 2: 细胞上清中抗 p30 重组抗体; 3: 细胞上清中抗 p54 重组抗体。

M: Protein molecular weight standard; 1. Blank control; 2: Anti-p30 recombinant antibody of supernatant; 3: Anti-p54 recombinant antibody of supernatant.

3.3.4 Western blotting 鉴定重组抗体与的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 分别转染 HEK293T 细胞；同时将 ASFV Pig/HLJ/18 株感染 PAMs 细胞（MOI=1），24 h 后分别收集细胞，以相应的重组抗体上清为一抗进行 Western blotting 检测。结果显示，分别能在 30 kDa、25 kDa 处检测到特异性条带，与 p30、p54 蛋白大小符合（图 3-5），表明本研究制备的重组抗体能够用于 Western blotting 检测。

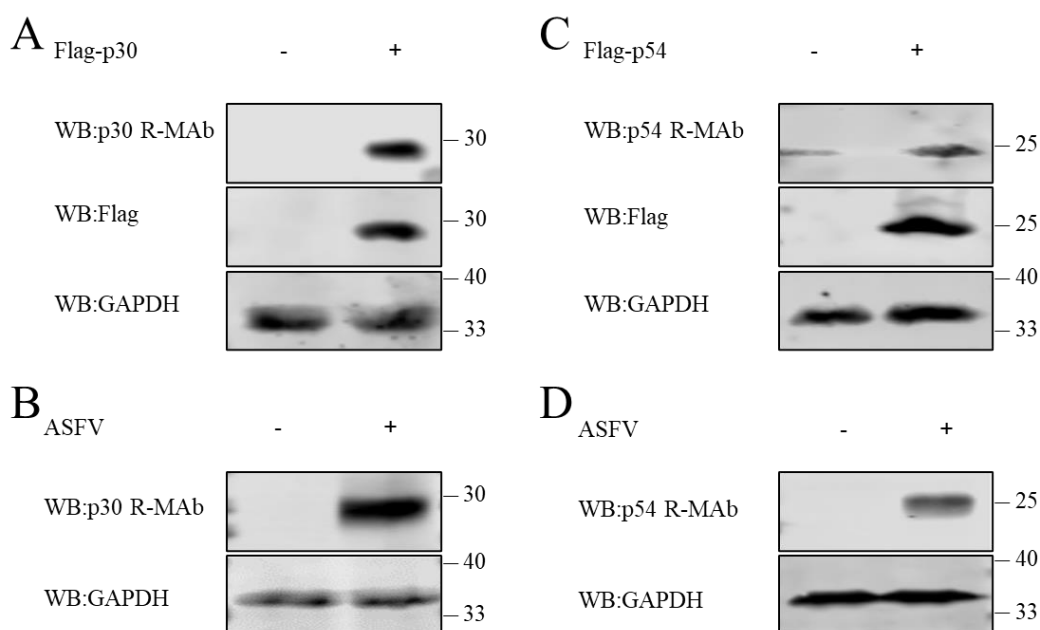


图 3-5 Western blotting 鉴定重组抗体的反应性

Fig 3-5. Identification of the reactivity of recombinant antibody by Western blotting

A: Western blotting 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p30 的表达; B: Western blotting 检测 ASFV 感染 PAMs 中细胞中 p30 的表达; C: Western blotting 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p54 的表达; D: Western blotting 检测 ASFV 感染 PAMs 中细胞中 p54 的表达。

A: Detection of the over-expressed Flag-p30 in HEK293T cells by Western blotting; B: Detection of the over-expressed p30 in ASFV-infected PAMs by Western blotting; C: Detection of the expression of Flag-p54 in HEK293T cells by Western blotting; D: Detection of the expression of p54 in ASFV-infected PAMs by Western blotting.

3.3.5 IFA 鉴定重组抗体与的 p30 和 p54 蛋白的反应性

将 pCAGGS-Flag-CP204L、pCAGGS-Flag-E183L 分别转染 HEK293T 细胞; 另外, 将 ASFV Pig/HLJ/18 感染 PAMs (MOI=1), 24 h 后固定细胞, 以相应的重组抗体上清为一抗进行 IFA 检测。结果显示, 使用重组抗体和鼠源 Flag 抗体孵育的细胞中呈现特异性的绿色荧光, 而阴性对照组未观察到绿色荧光 (图 3-6)。以上结果表明, 本研究制备的重组抗体能够用于 IFA 检测。

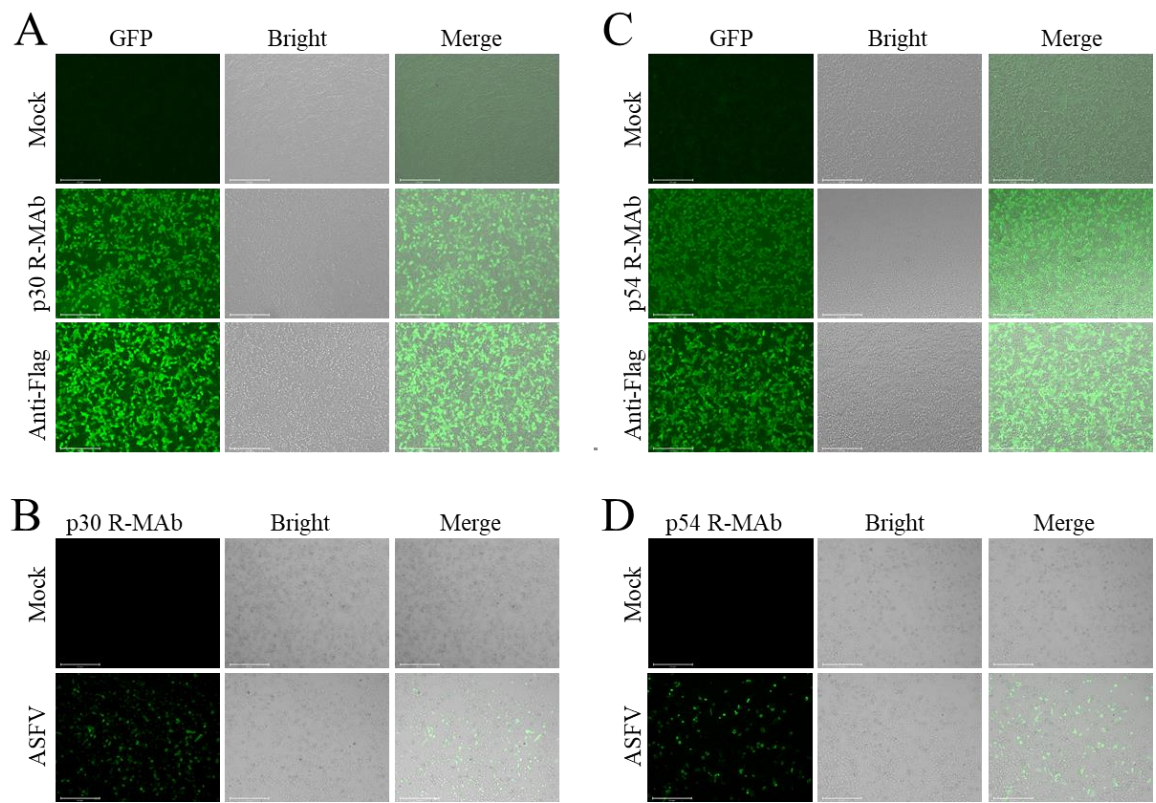


图 3-6 IFA 鉴定重组抗体的反应性

Fig 3-6. Identification of the reactivity of recombinant antibody by IFA

A: IFA 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p30 的表达; B: IFA 检测 ASFV 感染的 PAMs 中 p30 的表达; C: IFA 检测 HEK293T 细胞中 Flag-p54 的表达; D: IFA 检测 ASFV 感染的 PAMs 中 p54 的表达。

A: Detection of the over-expressed Flag-p30 in HEK293T cells by IFA; B: Detection of the expression of p30 in ASFV-infected PAMs by IFA; C: Detection of the over-expressed Flag-p54 in HEK293T cells by IFA; D: Detection of the expression of p54 in ASFV-infected PAMs by IFA.

3.4 讨论

抗体又称为免疫球蛋白，是一类由效应性 B 细胞所产生的蛋白，属于免疫球蛋白超基因家族，可以通过血液、淋巴液循环等方式分布于体内，是介导体液免疫应答的重要效应分子。抗体的结构呈“Y”字型，由 2 条重链和 2 条轻链组成 (PADLAN, 1994)。重链的分子量约为 50 kDa，有 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE 五种亚型；轻链的分子量约为 25 kDa，分为 κ 链 (kappa 链) 和 λ 链 (Lambda 链) 两种亚型。抗体分子的 N 端存在一段氨基酸序列变化较大的区域，称为可变区，是抗体与抗原结合的部位，它的氨基酸构成及排列方式直接影响其与抗原的结合能力。可变区由 3 个高变的 CDR 区和 4 个较保守的 FR 区构成，其中 CDR3 的超变程度最高，抗体的特异性和亲和力主要涉及到该区域的改造。重链可变区位于靠近 N 端 1/4 区域，轻链可变区位于靠近 N 端 1/2 区域 (BUTLER et al., 2000; PADLAN, 1994)。

在抗体制备方面，杂交瘤技术已有多年的历史，因其研发成本低、技术成熟且操作流程透明，受到广大的认可。但也存在一定的缺点，除了制备时间较长之外，使用杂交瘤技术最终获

得并保存的是能分泌抗体的杂交瘤细胞，存在多方面隐患。一方面，细胞多次传代会导致遗传不稳定，突变后可能导致杂交瘤细胞分泌抗体能力变弱，甚至不产生抗体；其次，杂交瘤细胞经过冻存后复苏，其活力可能下降，若保存方式不当，会造成细胞损伤，对细胞的健康状态都有影响；最后，在杂交瘤细胞培养时，还要注意黑胶虫、支原体和细菌等微生物污染的风险。

为了得到能稳定分泌和保存的抗体生产体系，本研究提取筛选得到抗 p30 和 p54 蛋白杂交瘤细胞的 RNA，反转录后，使用特异性引物对其 VH 和 VL 进行 PCR 扩增，经测序鉴定可变区结构完整。分别将得到的 VH 和 VL 基因连接至包含抗体重链、轻链恒定区序列的 pcDNA3.4 真核表达载体中，分别构建 VH 和 VL 的表达质粒。将 VH 和 VL 表达质粒共转染 HEK293T，对重组抗体进行表达，经 Western blotting 和 IFA 鉴定，2 株重组抗体均具有良好的反应性。抗体重组表达质粒的构建有利于有效抗体序列的保存，也为筛选制备猪源 ASFV 特异性抗体平台奠定基础。

3.5 小结

基于前一部分研究内容，构建了重组抗体表达系统，成功制备抗 p30 和 p54 蛋白的重组 MAbs，均具有良好的反应性，可用于 WB 和 IFA 试验。

第四章 结论

1. 表达并纯化了 ASFV p30 和 p54 蛋白，利用纯化的 p30 和 p54 蛋白免疫 BLAB/c 小鼠，分别制备了抗 p30 和 p54 的 MAbs，通过 Western blotting 和 IFA 鉴定，证明这 2 株 MAbs 均具有良好的反应性。

2. 构建了重组抗体表达系统，扩增出 p30 和 p54 杂交瘤细胞的 VH 和 VL 基因，连接至 pcDNA3.4 载体，使用哺乳动物蛋白表达系统对重组蛋白进行表达。经 Western blotting 和 IFA 鉴定，重组抗体具有良好的反应性。

参考文献

- 陈寅龙, 郑南南, 吴宏举, 侯浩宇, 李潮, 张昂克, 韩世充, 吴亚楠, 杜永坤, 2023. 非洲猪瘟病毒 K205R 蛋白的原核表达与单克隆抗体制备. 动物医学进展, 44(11): 1-7.
- 董娜, 2023. 非洲猪瘟病原学和流行病学进展研究. 吉林畜牧兽医, 44(05): 19-20.
- 扈荣良, 于婉琪, 陈腾, 2019. 非洲猪瘟及防控技术研究现状. 中国兽医学报, 39(2): 357-369.
- 矫健, 李建达, 韩先杰, 张琳, 张玉玉, 任素芳, 刘飞, 陈智, HRABCHENKO N, 张文娟, 于江, 吴家强, 2023. 非洲猪瘟病毒 p22 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. 山东农业科学, 55(10): 140-145.
- 李琦, 雷迎峰, 尹文, 2008. 核糖体展示单链抗体库技术及应用的研究进展. 微生物学免疫学进展, (03): 82-89.
- 李子萱, 张永红, 童津津, 崔德凤, 2023. 非洲猪瘟病毒结构蛋白 p54 的功能研究进展. 动物医学进展, 44(8): 72-75.
- 刘铭赫, 李巧玲, 李林姣, 程君生, 李俊平, 张媛, 彭小微, 王楠, 2022. 噬菌体展示技术及其在单克隆抗体制备中的应用. 中国兽药杂志, 56(12): 82-89.
- 陆田甜, 陈华云, 余群莲, 2023. 浅谈非洲猪瘟病毒研究进展及防控措施. 中国猪业, 18(06): 82-86.
- 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 陈梓杰, 黄靖倍, 陈且昕, 邹沛璇, 韩笑, 张纯. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略. 中国生物工程杂志, 2023, 43(9): 33-45.
- 仇华吉, 2018. 非洲猪瘟对我国养猪业的影响与防控建议. 中国兽药杂志, 52(11): 1-4.
- 王省, 2019. 利用单个 B 细胞抗体技术研制口蹄疫病毒 O 型全牛源单克隆工程抗体. 中国农业科学院.
- 魏德陇, 2021. 基于单个 B 细胞抗体技术研制 PRRSV 特异性单克隆抗体. 中国农业科学院.
- 魏天, 王成宇, 王凤杰, 李忠鹏, 张芳毓, 张守峰, 扈荣良, 吕礼良, 王永志. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体制备及线性抗原表位定位. 中国农业科学, 2022, 55(15): 3062-3070.
- 吴挺, 2023. 小鼠抗人 GP73 单克隆抗体的制备与鉴定. 扬州大学.
- 吴萌萌, 张栋良, 孙彩虹, 李罡, 董钊, 王新. 非洲猪瘟研究进展. 畜牧兽医杂志, 2022, 41(01): 43-47.
- 武荣飞, 杨溢, 王鹏志, 原志伟, 朱国强, 2022. 单克隆抗体制备技术最新研究进展. 中国预防兽医学报, 44(03): 333-337.
- 肖黎明, 龚玖瑜, 王畅, 陈恒悦, 栗向东, 金伯泉, 陈丽华, 2012. 抗 BAFF 单克隆抗体轻链和重链可变区基因的克隆及鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 28(01): 49-52.
- 杨磊, 王伟, 杨郇垚, 谷丽, 2020. 非洲猪瘟疫情影响下生猪定点屠宰企业消毒剂的选择. 农业技术与装备, 370(10): 136-137.
- 张依玲, 易文毅, 肖静, 张淑娟, 马秀云, 李文杰, 张传师, 2023. 非洲猪瘟的流行现状及防控措施. 猪业科学, 40(12): 90-92.
- 张雨, 秦晓东, 朱学亮, 殷相平, 李彦敏, 张志东, 2019. 基于单个 B 细胞抗 O 型口蹄疫病毒单克隆抗体的研制. 中国兽医科学, 49(09): 1082-1089.
- ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, ANDRÉS G, 2018. A Proteomic Atlas of the African Swine

- Fever Virus Particle. *J Virol*, 92(23): e01293-18. DOI: 10.1128/jvi.01293-18.
- ANDRÉS G, ALEJO A, SALAS J, SALAS M L, 2002. African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol*, 76(24): 12473-82. DOI: 10.1128/jvi.76.24.12473-12482.2002.
- BANJARA S, SHIMMON G L, DIXON L K, NETHERTON C L, HINDS M G, KVANSAKUL M, 2019. Crystal Structure of African Swine Fever Virus A179L with the Autophagy Regulator Beclin. *Viruses*, 11(9): 789. DOI: 10.3390/v11090789.
- BARDERAS M G, RODRÍGUEZ F, GÓMEZ-PUERTAS P, AVILÉS M, BEITIA F, ALONSO C, ESCRIBANO J M, 2001. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol*, 146(9): 1681-91. DOI: 10.1007/s007050170056.
- BOINAS F S, WILSON A J, HUTCHINGS G H, MARTINS C, DIXON L J, 2011. The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One*, 6(5): e20383. DOI: 10.1371/journal.pone.0020383.
- BOYERINAS B, JOCHEMS C, FANTINI M, HEERY C R, GULLEY J L, TSANG K, SCHLOM J, 2015. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a Novel Anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunology Research*, 3(10): 1148-1157. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0059.
- BUTLER J E, WEBER P, SINKORA M, SUN J, FORD S J, CHRISTENSON R K, 2000. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. II. Characterization of heavy chain complementarity-determining region 3 diversity in the developing fetus. *J Immunol*, 165(12): 6999-7010. DOI: 10.4049/jimmunol.165.12.6999.
- CADENAS-FERNÁNDEZ E, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, VAN DEN BORN E, KOSOWSKA A, VAN KILSDONK E, FERNÁNDEZ-PACHECO P, GALLARDO C, ARIAS M, BARASONA J A, 2021. High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge. *Vaccines (Basel)*, 9(3): 242. DOI: 10.3390/vaccines9030242.
- CAO S N, LU H P, WU Z, ZHU S Y, 2022. A duplex fluorescent quantitative PCR assay to distinguish the genotype I and II strains of African swine fever virus in Chinese epidemic strains. *Front Vet Sci*, 9: 998874. DOI: 10.3389/fvets.2022.998874.
- CARBONETTI S, OLIVER B G, VIGDOROVICH V, DAMBRAUSKAS N, SACK B, BERGL E, KAPPE S H I, SATHER D N, 2017. A method for the isolation and characterization of functional murine monoclonal antibodies by single B cell cloning. *Journal of Immunological Methods*, 11(2): 199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.010>.
- CARLSON J, ZANI L, SCHWAIGER T, Schwaiger T, Nurmoja I, Viltrop A, Vilem A, Beer M, Blome S, 2018. Simplifying sampling for African swine fever surveillance: assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs. *Transbound Emerg Dis*, 65(1): e165-e172. DOI:10.1111/tbed.12706.
- CARRASCOSA J L, CARAZO J M, CARRASCOSA A L, GARCÍA N, SANTISTEBAN A, VIÑUELA

- E, 1984. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, 132(1): 160-72. DOI: 10.1016/0042-6822(84)90100-4.
- CERUTI A, KOBIALKA R M, SSEKITOLEKO J, OKUNI J B, BLOME S, ABD EL WAHED A, TRUYEN U, 2021. Rapid Extraction and Detection of African Swine Fever Virus DNA Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Viruses*, 13(9): 1731. DOI: 10.3390/v13091731.
- DI NIRO R, SULIC A M, MIGNONE F, D'ANGELO S, BORDONI R, IACONO M, MARZARI R, GAIOTTO T, LAVRIC M, BRADBURY A R, BIANCONE L, ZEVIN-SONKIN D, DE BELLIS G, SANTORO C, SBLATTERO D, 2010. Rapid interactome profiling by massive sequencing. *Nucleic Acids Res*, 38(9): e110. DOI: 10.1093/nar/gkq052.
- DIXON L K, SANCHEZ-CORDON P J, GALINDO I, ALONSO C, 2017. Investigations of pro- and anti-apoptotic factors affecting African swine fever virus replication and pathogenesis. *Viruses*, 9(9): 241. DOI: 10.3390/v9090241.
- DIXON L K, STAHL K, JORI F, VIAL L, PFEIFFER D U, 2020. African swine fever epidemiology and control. *Annual Review of Animal Biosciences*, 8: 221-246 . DOI: 10.1146/annurev-animal-021419-083741.
- DIXON L K, SUN H, ROBERTS H, 2019. African swine fever. *Antiviral Res*, 165: 34-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
- ECKER D M, JONES S D, LEVINE H L, 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 7(1): 9-14. DOI: 10.4161/19420862.2015.989042.
- EUSTACE MONTGOMERY R, 1921. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 34: 159-191. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4).
- FUCHS C S, TOMASEK J, YONG C J, DUMITRU F, PASSALACQUA R, GOSWAMI C, SAFRAN H, DOS SANTOS L V, APRILE G, FERRY D R, MELICHAR B, TEHFE M, TOPUZOV E, ZALCBERG J R, CHAU I, CAMPBELL W, SIVANANDAN C, PIKIEL J, KOSHIJI M, HSU Y, LIEPA A M, GAO L, SCHWARTZ J D, TABERNERO J, 2014. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 383(9911): 31-39. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61719-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61719-5).
- GALINDO I, CUESTA-GEIJO M A, HLAVOVA K, MUNOZ-MORENO R, BARRADO-GIL L, DOMINGUEZ J, ALONSO C, 2015. African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis. *Virus Research*, 200: 45-55. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.01.022.
- GAO Y, XIA T, BAI J, ZHANG L, ZHENG H, JIANG P, 2022. Preparation of monoclonal antibodies against the viral p54 protein and a blocking ELISA for detection of the antibody against African swine fever virus. *Viruses*, 14(11): 2335. DOI: 10.3390/v14112335.
- GAUDREAULT N N, RICHT J A, 2019. Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus.

- Vaccines (Basel), 7(2): 56. DOI: 10.3390/vaccines7020056.
- GE S Q, LI J M, FAN X X, LIU F X, LI L, WANG Q H, REN W J, BAO J Y, LIU C J, WANG H, LIU Y T, ZHANG Y Q, XU T G, WU X D, WANG Z L, 2018. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018. *Emerg Infect Dis*, 24(11): 2131-2133. DOI: 10.3201/eid2411.181274.
- GILBERT A E, KARAGIANNIS P, DODEV T, KOERS A, LACY K, JOSEPHS D H, TAKHAR P, GEH J L, HEALY C, HARRIES M, ACLAND K M, RUDMAN S M, BEAVIL R L, BLOWER P J, BEAVIL A J, GOULD H J, SPICER J, NESTLE F O, KARAGIANNIS S N, 2011. Monitoring the systemic human memory B cell compartment of melanoma patients for anti-tumor IgG antibodies. *PLoS One*, 6(4): e19330. DOI: 10.1371/journal.pone.0019330.
- GÓMEZ-PUERTAS P, RODRÍGUEZ F, OVIEDO J M, RAMIRO-IBÁÑEZ F, RUIZ-GONZALVO F, ALONSO C, ESCRIBANO J M, 1996. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol*, 70(8): 5689-94. DOI: 10.1128/jvi.70.8.5689-5694.1996.
- GUINAT C, VERGNE T, JURADO-DÍAZ C, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, DIXON L, PFEIFFER D U, 2017. Effectiveness and practicality of control strategies for African swine fever: what do we really know? *Vet Rec*, 180(4): 97. DOI: 10.1136/vr.103992.
- HAIRUL BAHARA N H, TYE G J, CHOONG Y S, ONG E B, ISMAIL A, LIM T S, 2013. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals*, 41(4): 209-16. DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.04.001.
- HEMMINK J D, KHAZALWA E M, ABKALLO H M, ODUOR B, KHAYUMBI J, SVITEK N, HENSON S P, BLOME S, KEIL G, BISHOP R P, STEINAA L, 2022. Deletion of the CD2v Gene from the Genome of ASFV-Kenya-IX-1033 Partially Reduces Virulence and Induces Protection in Pigs. *Viruses*, 14(9): 1917. DOI: 10.3390/v14091917.
- HU Z Q, TIAN X G, LAI R R, WANG X L, LI X W, 2023. Current detection methods of African swine fever virus. *Front Vet Sci*, 10: 1289676. DOI: 10.3389/fvets.2023.1289676.
- IIZUKA A, KOMIYAMA M, TAI S, OSHITA C, KURUSU A, KUME A, OZAWA K, NAKAMURA Y, ASHIZAWA T, YAMAMOTO A, YAMAZAKI N, YOSHIKAWA S, KIOHARA Y, YAMAGUCHI K, AKIYAMA Y, 2011. Identification of cytomegalovirus (CMV)pp65 antigen-specific human monoclonal antibodies using single B cell-based antibody gene cloning from melanoma patients. *Immunology Letters*, 135(1): 64-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.09.013>.
- KAHRS R F, 1995. General disinfection guidelines. *Rev Sci Tech*, 14(1): 105-63. DOI: 10.20506/rst.14.1.836.
- KAZAKOVA A S, IMATDINOV I R, DUBROVSKAYA O A, IMATDINOV A R, SIDLIK M V, BALYSHEV V M, KRASOCHKO P A, SEREDA A D, 2017. Recombinant Protein p30 for Serological Diagnosis of African Swine Fever by Immunoblotting Assay. *Transbound Emerg Dis*, 64(5): 1479-1492. DOI: 10.1111/tbed.12539.
- LIAO H X, LEVESQUE M C, NAGEL A, DIXON A, ZHANG R, WALTER E, PARKS R, WHITESIDES J, MARSHALL D J, HWANG K K, YANG Y, CHEN X, GAO F, MUNSHAW S, KEPLER T B,

- DENNY T, MOODY M A, HAYNES B F, 2009. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, 158(1-2): 171-9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.02.014.
- LIPOVSEK D, PLÜCKTHUN A, 2004. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods*, 290(1-2): 51-67. DOI: 10.1016/j.jim.2004.04.008.
- LIU H C, LIU R C, HU M R, YANG A B, WU R H, CHEN Y, ZHANG J, BAI J S, WU S B, CHEN J P, LONG Y F, JIANG Y, ZHOU B, 2024. Development of high-concentration labeled colloidal gold immunochromatographic test strips for detecting african swine fever virus p30 protein antibodies. *Heliyon*, 10(3): e25214. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25214.
- LIU H X, SHI K C, ZHAO J, YIN Y W, CHEN Y T, SI H B, QU S J, LONG F, LU W J, 2022. Development of a one-step multiplex qRT-PCR assay for the detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and atypical porcine pestivirus. *BMC Vet Res*, 18(1): 43. DOI: 10.1186/s12917-022-03144-4.
- LIU J K, 2014. The history of monoclonal antibody development-Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)*, 3(4): 113-6. DOI: 10.1016/j.amsu.2014.09.001.
- LU W L, BAI Y L, ZHANG S, ZHAO X Y, JIN J X, ZHU X J, WANG R, WU Y N, ZHANG A K, ZHANG G P, ZHUANG G Q, SUN A J, 2023. An Intracellular Epitope of ASFV CD2v Protein Elicits Humoral and Cellular Immune Responses. *Animals (Basel)*, 13(12): 1967. DOI: 10.3390/ani13121967.
- LV C, ZHAO Y, JIANG L, ZHAO L, WU C, HUI X, HU X, SHAO Z, XIA X, SUN X, ZHANG Q, JIN M, 2021. Development of a Dual ELISA for the Detection of CD2v-Unexpressed Lower-Virulence Mutational ASFV. *Life (Basel)*, 11(11): 1214. DOI: 10.3390/life11111214.
- MUSHAGALUSA C A, ETTER E, PENRITH M L, 2021. Review of African swine fever outbreaks history in South Africa: From 1926 to 2018. *Onderstepoort J Vet Res*, 88(1): e1-e10. DOI: 10.4102/ojvr.v88i1.1919.
- NAH J J, KWON O K, CHOI J D, JANG S H, LEE H J, AHN D G, LEE K, KANG B, HAE-EUN K, SHIN Y K, 2022. Development of an indirect ELISA against African swine fever virus using two recombinant antigens, partial p22 and p30. *J Virol Methods*, 309: 114611. DOI: 10.1016/j.jviromet.2022.114611.
- NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12): E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- ONZERE C K, BASTOS A D, OKOTH E A, LICHOTI J K, BOCHERE E N, OWIDO M G, NDAMBUKI G, BRONSVOORT M, BISHOP R P, 2018. Multi-locus sequence typing of African swine fever viruses from endemic regions of Kenya and Eastern Uganda (2011-2013) reveals rapid B602L central variable region evolution. *Virus Genes*, 54(1): 111-123. DOI: 10.1007/s11262-017-1521-4.
- PADLAN E A, 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31(3): 169-217. DOI: 10.1016/0161-5890(94)90001-9.
- PENRITH M L, VOSLOO W, 2009. Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J*

- S Afr Vet Assoc, 80(2): 58-62. DOI: 10.4102/jsava.v80i2.172.
- PÉREZ-NÚÑEZ D, SUNWOO SY, GARCÍA-BELMONTE R, KIM C, VIGARA-ASTILLERO G, RIERA E, KIM DM, JEONG J, TARK D, KO YS, YOU YK, REVILLA Y. Recombinant African Swine Fever Virus Arm/07/CBM/c2 Lacking CD2v and A238L Is Attenuated and protects pigs against virulent Korean paju strain. *Vaccines*. 2022, 10(12): 1992. DOI: 10.3390/vaccines10121992.
- PETROVAN V, YUAN F, LI Y, SHANG P, MURGIA M V, MISRA S, ROWLAND R R R, FANG Y, 2019. Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus. *Virus Res*, 269: 197632. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.05.010.
- QIAN X, X HU L P, SHI K C, WEI H N, SHI Y W, HU X, ZHOU Q G, FENG S P, LONG F, MO S L, LI Z Q, 2023. Development of a triplex real-time quantitative PCR for detection and differentiation of genotypes I and II African swine fever virus. *Front Vet Sci*, 10: 10.3389/fvets.2023.1278714. DOI: 10.3389/fvets.2023.1278714.
- REICKS D L, 2019. Effective biosecurity to protect North American studs and clients from emerging infectious disease. *Theriogenology*, 137: 82-87. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.041.
- REIS A L, PARKHOUSE R M E, PENEDOS A R, MARTINS C, LEITAO A, 2007. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *Journal of General Virology*, 88(9): 2426-2434. DOI: 10.1099/vir.0.82857-0.
- RODRIGUEZ J M, GARCIA-ESCUADERO R, SALAS M L, ANDRES G, 2004. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *Journal of Virology*, 78(8): 4299-4313. DOI: 10.1128/jvi.78.8.4299-4313.2004.
- ROJO G, GARCÍA-BEATO R, VINUELA E, SALAS M A L, SALAS J, 1999. Replication of african swine fever virus DNA in infected cells. *Virology*, 257: 24–536. DOI: 10.1006/viro.1999.9704.
- SALAS M L, ANDRES G, 2013. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Research*, 173(1): 29-41. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.09.016.
- SANCHEZ-CORDON P J, MONTOYA M, REIS A L, DIXON L K, 2018. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *The Veterinary Journal*, 233: 41-48. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.12.025.
- SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, MUR L, MARTÍNEZ-LÓPEZ B, 2012. African Swine Fever: An Epidemiological Update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(s1): 27-35. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x>.
- SASTRE P, PÉREZ T, COSTA S, YANG X, RÄBER A, BLOME S, GOLLER K V, GALLARDO C, TAPIA I, GARCÍA J, SANZ A, RUEDA P, 2016. Development of a duplex lateral flow assay for simultaneous detection of antibodies against African and Classical swine fever viruses. *J Vet Diagn Invest*, 28(5): 543-9. DOI: 10.1177/1040638716654942.
- SHEN Z Y, QIU W C, LUAN H R, SUN C X, CAO X Y, WANG G, PENG J, 2023. I329L protein-based indirect ELISA for detecting antibodies specific to African swine fever virus. *Front Cell Infect Microbiol*, 13: 1150042. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1150042.
- TAJIRI K, OZAWA T, JIN A, TOKIMITSU Y, MINEMURA M, KISHI H, SUGIYAMA T,

- MURAGUCHI A, 2010. Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Res*, 87(1): 40-9. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.04.006.
- THATCHER N, HIRSCH F R, LUFT A V, SZCZESNA A, CIULEANU T E, DEDIU M, RAMLAU R, GALIULIN R K, BÁLINT B, LOSONCZY G, KAZARNOWICZ A, PARK K, SCHUMANN C, RECK M, DEPENDROCK H, NANDA S, KRULJAC-LETUNIC A, KUREK R, PAZ-ARES L and SOCINSKI M A, 2015. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 16(7): 763-774. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00021-2).
- TILLER T, BUSSE C E, WARDEMANN H, 2009. Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *Journal of Immunological Methods*, 350(1): 183-193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.08.009>.
- TOMITA M, TSUMOTO K, 2011. Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 3(3): 371-80. DOI: 10.2217/imt.11.4.
- WAN Y, SHI Z W, PENG G C, WANG L J, LUO J C, RU Y, ZHOU G J, MA Y, SONG R, YANG B, CAO L Y, TIAN H, ZHENG H X, 2022. Development and application of a colloidal-gold dual immunochromatography strip for detecting African swine fever virus antibodies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(2): 799-810. DOI: 10.1007/s00253-021-11706-z.
- WANG D G, YU J H, WANG Y Z, ZHANG M, LI P, LIU M, LIU Y H, 2020. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *Journal of Virological Methods*, 276: 113775. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113775>.
- WANG N, ZHAO D M, WANG J L, ZHANG Y L, WANG M, GAO Y, LI F, WANG J F, BU Z G, RAO Z, WANG X X, 2019. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly. *Science*, 366(6465): 640-644. DOI: 10.1126/science.aaz1439.
- WANG X, STOLLAR B D, 2000a. Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. *J Immunol Methods*, 244(1-2): 217-25. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00260-x.
- WEINER L M, SURANA R, WANG S, 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 10(5): 317-27. DOI: 10.1038/nri2744.
- WEN X Y, XIE Q Y, LI J H, PEI Y R, BAI Y, LIU F, CUI H Y, SHAO G Q, FENG Z X, 2022. Rapid and sensitive detection of African swine fever virus in pork using recombinase aided amplification combined with QDMs-based test strip. *Anal Bioanal Chem*, 414(13): 3885-3894. DOI: 10.1007/s00216-022-04030-6.
- WU K, LIU J, WANG L, FAN S, LI Z, LI Y, YI L, DING H, ZHAO M, CHEN J, 2020. Current State of Global African Swine Fever Vaccine Development under the Prevalence and Transmission of ASF in China. *Vaccines (Basel)*, 8(3): 531. DOI: 10.3390/vaccines8030531.
- WU K, ZHANG Y, ZENG S, LIU X, LI Y, LI X, CHEN W, LI Z, QIN Y, CHEN J, FAN S, 2021.

- Development and Application of RAA Nucleic Acid Test Strip Assay and Double RAA Gel Electrophoresis Detection Methods for ASFV and CSFV. *Front Mol Biosci*, 8: 811824. DOI: 10.3389/fmolb.2021.811824.
- YANG H, PENG Z, SONG W, ZHANG C, FAN J, CHEN H, HUA L, PEI J, TANG X, CHEN H, WU B, 2022. A triplex real-time PCR method to detect African swine fever virus gene-deleted and wild type strains. *Front Vet Sci*, 9: 943099. DOI: 10.3389/fvets.2022.943099.
- ZHAO J, ZHU J, WANG Y, YANG M, ZHANG Q, ZHANG C, NAN Y, ZHOU E M, SUN Y, ZHAO Q, 2022. A simple nanobody-based competitive ELISA to detect antibodies against African swine fever virus. *Virol Sin*, 37(6): 922-933. DOI: 10.1016/j.virs.2022.09.004.
- ZHOU L, ZHONG R, HAO W, WANG H, FAN X, ZHANG L, MI Q, 2009. Interleukin-10 and interferon- γ up-regulate the expression of B-cell activating factor in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 87(1): 104757 .DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.04.002>.
- ZHOU X, LI N, LUO Y, LIU Y, MIAO F, CHEN T, ZHANG S, CAO P, LI X, TIAN K, QIU H J, HU R, 2018. Emergence of African Swine Fever in China, 2018. *Transbound Emerg Dis*, 65(6): 1482-1484. DOI: 10.1111/tbed.12989.
- ZOST S J, GILCHUK P, CHEN R E, CASE J B, REIDY J X, TRIVETTE A, NARGI R S, SUTTON R E, SURYADEVARA N, CHEN E C, BINSSTEIN E, SHRIHARI S, OSTROWSKI M, CHU H Y, DIDIER J E, MACRENARIS K W, JONES T, DAY S, MYERS L, EUN-HYUNG LEE F, NGUYEN D C, SANZ I, MARTINEZ D R, ROTHLAUF P W, BLOYET L M, WHELAN S P J, BARIC R S, THACKRAY L B, DIAMOND M S, CARNAHAN R H, CROWE J E, JR., 2020. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med*, 26(9): 1422-1427. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x.