

分类号_____

U D C _____

学 号 MZ120211521

密 级 _____



硕 士 学 位 论 文

(全日制专业学位)

非洲猪瘟病毒免疫保护相关抗原的表达 和免疫效力评价

学 院： 兽医学院

专 业 学 位 类 别： 兽医硕士

专 业 学 位 领 域： 不分领域

研 究 生： 冯明灿

校 内 指 导 教 师： 秦涛 教授

校 外 指 导 教 师： 李玉和 研究员

扬州优邦生物制药有限公司

答 辩 委 员 会 主 席： 周斌 教授

答 辩 日 期： 2024 年 5 月 31 日

**Expression and immunoefficacy evaluation of
antigens associated with immune protection of
african swine fever virus**

A thesis submitted to
Yangzhou University
in partial fulfillment of the requirements
for the
Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By
Mingcan Feng
Supervisor: Prof. Tao Qin
Co-supervisor: Prof. Yuhe Li
Master of Professional Degree in Veterinary Medicine
May 2024

非洲猪瘟病毒免疫保护相关抗原的表达 和免疫效力评价

本论文研究得到国家重点研发计划课题（基于病毒基因组复制关键基因的复制缺陷型非洲猪瘟基因缺失候选疫苗研制，编号：2021YFD1801201-2）资助。

目 录

文献综述:非洲猪瘟概述及亚单位疫苗研究进展	1
1 ASF 概述.....	1
1.1 ASFV 结构和生物学特性.....	1
1.2 ASF 流行病学.....	3
1.3 ASFV 传播方式.....	4
1.4 ASF 的诊断.....	5
1.5 ASF 疫苗.....	6
1.6 ASFV 培养用细胞.....	8
2 ASF 亚单位疫苗研究进展	9
2.1 ASFV 抗原研究进展.....	9
2.2 佐剂研究进展.....	11
2.3 ASF 亚单位疫苗的应用.....	12
3 研究目的与意义.....	14
参考文献.....	15
第一章 ASFV 重组抗原的原核表达和纯化	23
1 材料.....	23
1.1 载体、菌株.....	23
1.2 实验试剂和试剂盒.....	24
1.3 仪器设备.....	24
1.4 所需溶液配制.....	25
2 方法.....	26
2.1 引物的设计与合成.....	26
2.2 重组载体的构建.....	26
2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化.....	31
3 结果.....	34
3.1 Hsp70c 基因的扩增结果	34
3.2 pET30a-Hsp70c 重组载体菌液 PCR 结果.....	34
3.3 重组抗原载体菌液 PCR 鉴定	35
3.4 重组抗原载体酶切鉴定.....	36
3.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定结果.....	37
3.6 重组蛋白的 Western blot 鉴定结果	40
4 讨论.....	42
参考文献.....	44
第二章 ASFV 重组蛋白在昆虫细胞中的表达与纯化	46

1 材料.....	46
1.1 质粒、细胞系、菌株.....	46
1.2 主要试剂.....	47
1.3 试剂配制.....	47
2 方法.....	47
2.1 引物设计.....	47
2.2 重组质粒的构建和鉴定.....	49
2.3 重组杆粒的构建和鉴定.....	50
2.4 重组蛋白的纯化.....	52
3 结果.....	52
3.1 ASFV 抗原与信号肽的扩增.....	52
3.2 重组载体菌液 PCR 鉴定.....	53
3.3 重组载体的酶切鉴定.....	54
3.4 杆状病毒载体菌液 PCR 鉴定.....	55
3.5 重组杆状病毒的拯救及其 IFA 鉴定.....	56
3.6 重组蛋白的 Western blot 检测.....	57
3.7 重组蛋白的纯化.....	58
4 讨论.....	59
参考文献.....	62
第三章 原核表达 ASFV 重组蛋白猪的免疫试验.....	64
1 材料.....	64
1.1 蛋白、病毒、实验动物.....	64
1.2 实验试剂.....	65
1.3 主要试剂配制.....	65
2 方法.....	65
2.1 动物免疫试验.....	65
2.2 猪血清特异性抗体检测.....	66
2.3 猪淋巴细胞增殖检测.....	66
2.4 数据的统计和分析.....	68
3 结果.....	68
3.1 特异性抗体水平检测结果.....	68
3.2 淋巴细胞增殖水平检测结果.....	69
3.3 细胞因子水平检测结果.....	71
4 讨论.....	71
参考文献.....	74
全文总结.....	76

摘要

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起能导致猪致死性极高的传染病。自 2018 年 ASF 在中国沈阳爆发, 随后在其他省份相继蔓延, 由于无防治药物和疫苗, 一旦发生 ASF 会给养猪业造成毁灭性的打击。近期研究发现, 亚单位疫苗可以诱导猪产生较高的体液和细胞免疫应答, 对于防控 ASF 有较好前景。因此, 本研究拟通过构建和表达 ASFV 保护性相关抗原及组合, 制备亚单位疫苗, 进一步评价其免疫效力, 为 ASF 防控提供技术支撑。

1. ASFV 重组抗原的原核表达与纯化

首先对 ASFV 保护性相关抗原进行分析, 设计不同抗原组合, 进一步优化原核表达密码子并全基因合成, 与佐剂蛋白热应激蛋白 70c (Heat shock protein, Hsp70c) 融合构建原核表达载体, 包括 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 共 5 个载体。其次, 重组质粒测序正确后, 将各重组载体转入宿主菌 BL21 中, 通过优化不同温度、诱导剂浓度等条件, SDS-PAGE 试验结果表明, 各重组蛋白在上清中成功表达, Western blot 试验结果显示, 各重组蛋白能够与 ASFV 阳性血清发生反应, 大小正确。通过 NI-NTA 亲和层析介质纯化, SDS-PAGE 试验检测表明, 成功获得了高纯度的重组蛋白, 蛋白浓度达 0.78~1.72 mg/mL。本研究为后续 ASFV 原核表达亚单位疫苗的制备奠定基础。

2. 基于杆状病毒载体的 ASFV 重组抗原表达与纯化

首先, 根据 ASFV (JS 株) 的基因序列, 克隆 ASFV 保护性相关抗原基因, 并将其构建至杆状病毒转移载体 pFastbac HT A 上, 同时引入杆状病毒信号肽序列 gp64。重组质粒测序表明, 成功构建重组杆状病毒转移载体, 包括 pFastbac HT A-gp64-M448R、pFastbac HT A-gp64-E146L、pFastbac HT A-gp64-E199L、pFastbac HT A-gp64-I177L、pFastbac HT A-gp64-MGF110-4L 共 5 个载体。其次, 将各重组质粒分别转座至 DH10Bac 感受态中, 经过蓝白斑筛选后, 成功构建杆状病毒重组质粒, 包括 rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、

rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 共 5 个质粒。第三，将各重组杆状病毒质粒分别转染至昆虫细胞 sf9 后，通过 Western blot 试验验证，结果显示各重组蛋白可以与标签抗体 His 单抗发生特异性反应，表明各目的蛋白成功表达。通过 NI-NTA 亲和层析介质纯化，SDS-PAGE 试验检测表明，成功获得了高纯度的重组蛋白，蛋白浓度达 0.32~0.88 mg/mL。本研究为后续 ASFV 真核表达亚单位疫苗的制备及 ASFV 血清抗体检测奠定基础。

3. ASFV 原核表达亚单位疫苗免疫效力评价

首先，将第一章成功表达和纯化的各重组抗原，包括 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 共 5 种重组抗原进行均匀混合 (按每种蛋白 200 μ g)，随后混合液与弗氏佐剂以 1: 1 比例乳化后制备亚单位疫苗。其次，开展猪体内试验。将试验猪分为 PBS 对照组和免疫组 ($n=15$)，采用颈部肌肉注射途径对猪只进行三次免疫 (1 d, 8 d 和 28 d)。随后分别于首免后 21 d、45 d、60 d、75 d 和 90 d 对猪只进行颌下静脉采血，提取血清用于 ASFV 特异性抗体检测，从抗凝血中分离猪外周血淋巴细胞用于淋巴细胞增殖试验和细胞因子测定试验。利用第二章制备的重组蛋白 rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 建立间接 ELISA 检测方法。结果显示，争对 E199L、E146L、M448R、I177L、MGF110-4L 的抗体均能在首免后 21 d 极显著增加 ($P<0.01$)，在 45 d 和 60 d 逐渐升高 ($P<0.01$)，并且在 60 d 达到最高的抗体水平，使试验猪产生较高的体液免疫。淋巴细胞增殖试验结果显示，运用单个抗原或五种混合抗原再刺激淋巴细胞后，与 PBS 组相比，首免后 21 d 免疫组 (混合抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力极显著增加 ($P<0.01$)，免疫组 (F5 抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力显著增加 ($P<0.05$)；首免后 60 d，免疫组 (混合抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力极显著增加 ($P<0.01$)，免疫组 (F1/F2/F3/F4/F5 抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力显著增加 ($P<0.05$)。首免后 90 d，免疫组 (混合抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力极显著增加 ($P<0.01$)，免疫组 (F1/F2/F3/F4/F5 抗原刺激) 淋巴细胞增殖能力有上升趋势，但不显著增加 ($P>0.05$)。运用商品化细胞因子 ELISA 检测试剂盒对淋巴细胞分泌细胞因子的能力进行检测，结果显示，与 PBS 组相比，首免后 21 d IFN- γ 、IL-10 显著上升

($P<0.05$)；首免后 60 d 和 90 d, IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 均显著上升 ($P<0.05$)。各细胞因子在首免后 60 d 达到高峰。上述结果表明重组 ASFV (F1-F5 组合) 亚单位疫苗具有较好的免疫应答水平, 为后续该类疫苗的系统性评价奠定重要基础。

关键词：非洲猪瘟；亚单位疫苗；原核表达；杆状病毒载体

Abstract

African swine fever (ASF) is an infectious disease caused by the African swine fever virus (ASFV), which is extremely deadly in pigs. Since the outbreak of ASF in Shenyang, China, in 2018, ASFV quickly spread to other provinces. Once ASF occurs, it will cause a devastating blow to the pig industry because of no control drugs and vaccines. Recent studies showed that the subunit vaccine can induce higher humoral and cellular immune responses in pigs, which has a good prospect for the prevention and control of ASF. Therefore, this study constructed and expressed ASFV protective related antigens and their combination for preparing subunit vaccine, and then the immune efficacy was evaluated, which will provide technical support for the prevention and control of ASF.

1. Prokaryotic expression and purification of ASFV recombinant antigens

Firstly, the protective associated antigens of ASFV were analyzed, different antigen combinations were designed, the prokaryotic expression codon was further optimized and the whole gene was synthesized, and then the prokaryotic expression vectors were constructed by fusion with the adjuvant protein Heat shock protein (Hsp70c), including pET30a-M448R-I73R-Hsp70c(F1), pET30a-p37-I177L-Hsp70c(F2), pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c(F3), pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp 70c(F4), and pET30a-E199L-F317L-Hsp70c detransmembrane (F5), 5 vectors in total. Secondly, after the recombinant plasmid was sequenced correctly, each recombinant vector was transferred into the host bacterium BL21. After optimizing different conditions such as temperature and concentration of inducer, SDS-PAGE results showed that each recombinant protein was successfully expressed in the supernatant, and Western blot results showed that each recombinant protein could react with ASFV-positive serum and the size of target protein is correct. The recombinant protein was purified by NI-NTA affinity chromatography and the SDS-PAGE showed that the each recombinant protein with high purity was successfully obtained, and the protein concentrations are 0.78~1.72 mg/mL. This study laid a foundation for the

preparation of ASFV prokaryotic expression subunit vaccine.

2. Expression and purification of recombinant ASFV antigen based on baculovirus vector

Firstly, according to the gene sequence of ASFV (JS strain), the protective associated antigen gene of ASFV was cloned and constructed into the baculovirus transfer vector pFastbac HT A, meanwhile the baculovirus signal peptide sequence gp64 was introduced. Recombinant plasmid sequencing showed that the recombinant baculovirus transfer vectors were successfully constructed, including pFastbac HT A-gp64-M448R, pFastbac HT A-gp64-E146L, pFastbac HT A-gp64-I177L, and pFastbac HT A-gp64-E199L, 4 vectors in total. Secondly, each recombinant plasmid was transferred to the DH10Bac competent cells. Moreover, five baculovirus recombinant plasmids were successfully constructed after blue-white spot screening, including rBacmid-gp64-E146L, rBacmid-gp64-M448R, rBacmid-gp64-I177L, and rBacmid-gp64-E199L. Thirdly, after transfecting each recombinant baculovirus plasmid into insect cells sf9, western blot showed that each recombinant protein can react specifically with the His monoclonal antibody, indicating each target protein was successfully expressed. The recombinant protein was purified by NI-NTA affinity chromatography and the SDS-PAGE showed that the each recombinant protein with high purity was successfully obtained, and the protein concentrations are 0.32~0.88 mg/mL. This study laid a foundation for preparation of ASFV eukaryotic expression subunit vaccine and detection of ASFV serum antibody.

3. Evaluation of immunological efficacy of ASFV prokaryotic expression subunit vaccine

First of all, the recombinant antigens successfully expressed and purified in Chapter one, a total of 5 recombinant antigens, including pET30a-M448R-I73R-Hsp70c(F1), pET30a-p37-I177L-Hsp70c(F2), pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3), pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp 70c (F4), and pET30a-

E199L-F317L-Hsp70c detransmembrane (F5) , was uniformly mixed (200 µg per protein), and then the mixture was emulsified with Freund's adjuvant in 1:1 ratio to prepare subunit vaccine. Secondly, *in vivo* experiments were carried out. The experimental pigs were divided into PBS control group and immune group (n=15), and the pigs were immunized three times (day 1, day 8, and day 28) by neck intramuscular injection. Submaxillary vein blood samples were taken from pigs at 21, 45, 60, 75, and 90 days after first immunization, and serum was extracted for ASFV-specific antibody detection. Porcine peripheral blood lymphocytes were isolated from anticoagulants for lymphocyte proliferation and cytokine detection. Recombinant proteins rBacmid-gp64-E146L, rBacmid-gp64-M448R, rBacmid-gp64-I177L, rBacmid-gp64-E199L and rBacmid-gp64-MGF110-4L prepared in Chapter 2 were used to detect specific antibodies by indirect ELISA, and the results showed that the antibodies of E199L, E146L, I177L, M448R and were significantly increased at 21 days after immunization ($P<0.01$) and gradually increased at day 45 and day 60 ($P<0.01$), and the highest antibody levels were reached at day 60. It can effectively stimulate the strong humoral immune response in experimental pigs. The results of lymphocyte proliferation assay showed that after restimulation of lymphocytes with single antigen or five mixed antigens, the proliferation ability of lymphocytes in the immune group (stimulated by mixed antigen) was significantly increased ($P<0.01$) and that in the immune group (stimulated by F5 antigen) was significantly increased ($P<0.05$) at 21 days after initial immunization compared with that in the PBS group. 60 days after the first dose, the proliferation capacity of lymphocytes in the immune group (mixed antigen stimulation) was significantly increased ($P<0.01$), and that in the immune group (F1/F2/F3/F4/ F5 antigen stimulation) was significantly increased ($P<0.05$). 90 days after the first dose, the proliferation capacity of lymphocytes in the immune group (stimulated by mixed antigen) was extremely significantly increased ($P<0.01$), and that in the immune group (stimulated by F1/F2/F3/F4/F5 antigen) was increased, but not significantly increased ($P>0.05$). Commercial cytokine ELISA kit was used to detect the ability of lymphocytes to secrete cytokines. The results showed that IFN- γ and IL-10 were significantly increased at 21 days after the first dose compared with PBS group ($P<0.05$). IFN- γ , IL-2 and IL-10 were significantly increased at 60 and 90 days after the first dose ($P<0.05$).

All cytokines reached the peak at the 60 days after the first dose. These results indicated that the recombinant ASFV (F1-F5 combination) subunit vaccine had a good immune response level, which will lay an important foundation for the subsequent systematic evaluation of this type of vaccine.

Key words: African swine fever; Subunit vaccine; Prokaryotic expression; Baculovirus vector

符号说明

英文缩写	英文全称	中文名称
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
ASF	African swine fever	非洲猪瘟
ASFV	African swine fever virus	非洲猪瘟病毒
BCA	Bicinchoninic acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
bp	Base pair	碱基对
CCK8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DC	Dendritic cell	树突状细胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
g	Gram	克
h	Hour	小时
HAD	Hemadsorption	红细胞吸附
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSP70	Heat shock protein 70	热休克蛋白 70
IFN	Interferon	干扰素
IL	Interleukin	白介素
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光试验
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
kb	Kilo base	千碱基对
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Liter	升
min	Minute	分钟
MGF	Multi-gene family	多基因家族
nm	Nanometer	纳米
OIE	Office international des epizooties	世界动物卫生组织
ORF	Open reading frame	开放阅读框
OD	Optical density	光密度

符号说明（续表）

英文缩写	英文全称	中文名称
PRRSV	Prague strain of rous sarcoma virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
PBMC	Porcine bone marrow monocytes cell	猪骨髓单核细胞
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate buffered saline with Tween	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Ploymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	荧光定量 PCR
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
V	Volts	伏特
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹

文献综述：非洲猪瘟概述及亚单位疫苗研究进展

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起, 能导致猪类致死性极高的传染病, 急性病例致死率几乎是 100%^[1]。自 1921 年在非洲肯尼亚首次爆发以来, 该病毒迅速在世界各地蔓延, 给全球养猪业带来了巨大威胁。2018 年, ASF 在中国沈阳首次爆发, 并随后在其他省份迅速传播, 严重制约我国养猪业发展。目前, 全球范围内尚无有效的药物能够治疗 ASF, 因此扑杀感染动物是目前最有效的防控手段。疫苗免疫是目前防控传染病的主要方法。因此, 为应对当下的 ASFV 流行, 研发出有效防控 ASF 的疫苗迫在眉睫。最近研究发现, 亚单位疫苗对于防控 ASFV 具有良好前景。但是亚单位疫苗免疫原性有限, 需要配合合适的佐剂来增强抗原的免疫效力。此外, ASFV 病毒结构复杂, 大部分抗原功能尚不清楚, 因此, 选择合适的保护性抗原和佐剂成为了目前研究 ASF 亚单位疫苗的重要任务。

1 ASF 概述

1.1 ASFV 结构和生物学特性

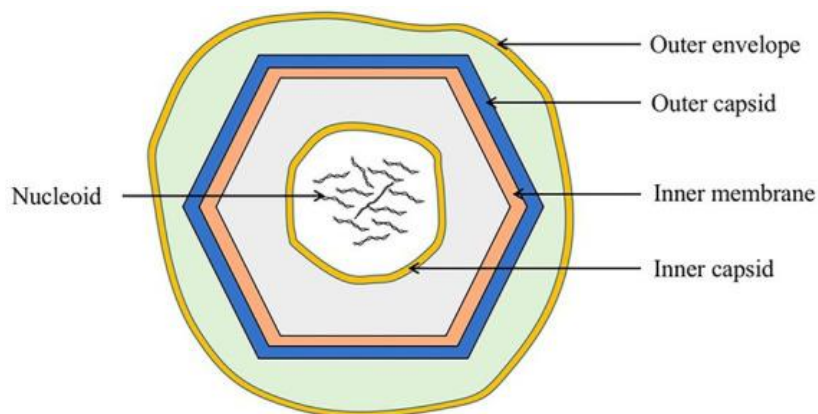
ASFV 属于非洲猪瘟病毒科, 非洲猪瘟病毒属, 是唯一已知的 DNA 虫媒病毒。根据 B646L 和 EP402R 基因可将 ASFV 分为 24 个基因型和 8 个血清型。基因组是一个全长 170 ~ 190 kb 的线性双链 DNA 分子, 编码超过 150 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 病毒粒子直径约为 200 nm^[2]。病毒组成结构包括包膜、衣壳、内膜、核壳和基因组, 与其他 DNA 病毒相比, 该病毒具有多层结构和整体二十面体形态^[3]。

在细胞内, ASFV 有一个包含基因组的内核, 这是它的核心部分, 为病毒第一层。这个内核被一层厚实的蛋白质层所包围, 这层蛋白质被称为核壳, 它是 ASFV 的第二层。核壳的主要功能是保护病毒的基因组免受外界环境的破坏。核壳进一步被内层囊膜包裹, 形成了病毒的第三层。这层囊膜在病毒复制和感染过程中起着关键的作用, 它可能参与了病毒与宿主细胞之间的相互作用。接下来是

病毒的第四层，即二十面体蛋白衣壳。这个衣壳由大量的蛋白质亚单位组成，它们精确地排列在一起，形成了病毒的外壳。这个外壳不仅进一步增强了病毒结构的稳定性，还参与了病毒与宿主细胞受体的结合，从而引导病毒进入细胞^[4, 5]。当 ASFV 从细胞内释放出来时，它会通过生成质膜获得一个外层囊膜，这是病毒的第五层。这个外层囊膜有助于病毒在细胞外环境中的稳定性和传播能力，使得病毒能够更容易地感染新的宿主细胞^[6]。这五层结构共包含超过 50 种蛋白质，每种蛋白质都在病毒的生命周期中发挥着特定的作用。这些蛋白质不仅参与了病毒结构的构建和维护，还参与了病毒的复制、组装和感染过程。

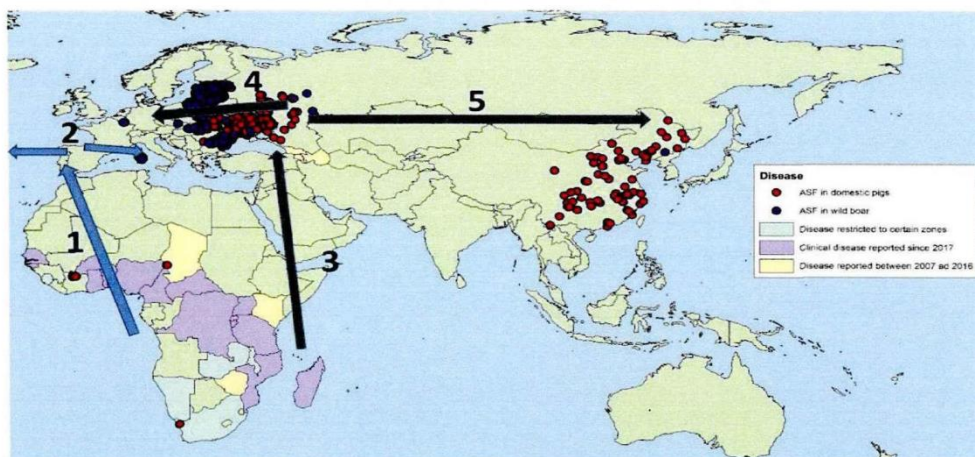
ASFV 感染宿主细胞经历以下六个步骤：首先病毒与宿主细胞受体结合，病毒吸附完成。第二步病毒吸附完成后，通过内化或者内吞和胞饮的作用侵入细胞，感染后的 30 min 内进入早期内体，约在 30 至 90 min 内转运至晚期内体。第三步 ASFV 在晚期内体中完成脱壳和释放过程，病毒只有脱去蛋白衣壳基因组才能发挥作用。第四步病毒基因组完成脱壳后便开始基因的表达，分为早期、中期和晚期。病毒侵染宿主细胞后 4 至 6 h，早期基因开始表达，主要是 ASFV 复制的蛋白；在感染后 6 至 8 h 进行 ASFV 基因组的复制，基因组主要在细胞质中进行，在细胞核也有短暂的过程。第五步复制完成后 8 至 16 h，病毒粒子的结构蛋白开始构成，中期和晚期的基因也开始表达。在 16 至 24 h 后，病毒粒子开始组装，最后感染 24 h 后病毒出芽释放^[7]。

ASFV 基因组庞大，编码 150-200 种蛋白，包括 60 多种结构蛋白和 100 多种非结构蛋白^[8]。目前，大约已知 50 种 ASFV 编码基因蛋白的功能^[9]。例如，许多 ASFV 基因能够抑制宿主防御系统，包括阻止宿主分泌 I 型干扰素和程序性细胞死亡或凋亡等，这种抑制机制使得病毒能够更好地在宿主体内生存和复制，增加了 ASFV 致病性和传播能力^[10]。DNA 聚合酶会对病毒编码进行精确校对，并且具有修复碱基的能力，使得 ASFV 的 DNA 不易突变，导致 ASFV 缺乏与其他病毒重组的能力，从而限制了其跨物种传播的可能性^[11]。

图 1-1 ASFV 结构示意图^[3]

1.2 ASF 流行病学

在 20 世纪初，ASF 在东非作为一种急性出血热报道，感染该病的所有猪类几乎全部死亡，感染源被确定是一种在原始森林中循环传播的病毒^[12]。从 1958 年开始，ASFV 在撒哈拉以南大多数的非洲国家蔓延开来，至今仍未停止^[13]。随着时间的推移，ASFV 跨大陆传播，首先在 1957 至 1960 年的葡萄牙开始流行，从葡萄牙传播到欧洲其他国家、加勒比和巴西。到 20 世纪 90 年代中期，除撒丁岛外，ASF 在这些地区一直流行。2007 年，非洲猪瘟传入高加索地区的格鲁吉亚，随后传播到俄罗斯联邦、乌克兰和白俄罗斯，并于 2014 年传播到欧盟波罗的海国家和波兰。到 2018 年，感染蔓延到比利时、匈牙利、捷克共和国、罗马尼亚、保加利亚、斯洛伐克和塞尔维亚^[14]。同年，中国的首例 ASF 在辽宁沈阳爆发（基因Ⅱ型毒株），随后开始在各省份蔓延^[15]。至今，尽管全球多个国家和地区都在努力防控 ASFV，但成功消灭该病的国家依然很少，大多数国家和地区仍在流行^[16]。目前还没有预防和治疗 ASFV 的有效疫苗和药物，一旦发生会造成巨额经济损失^[17]。

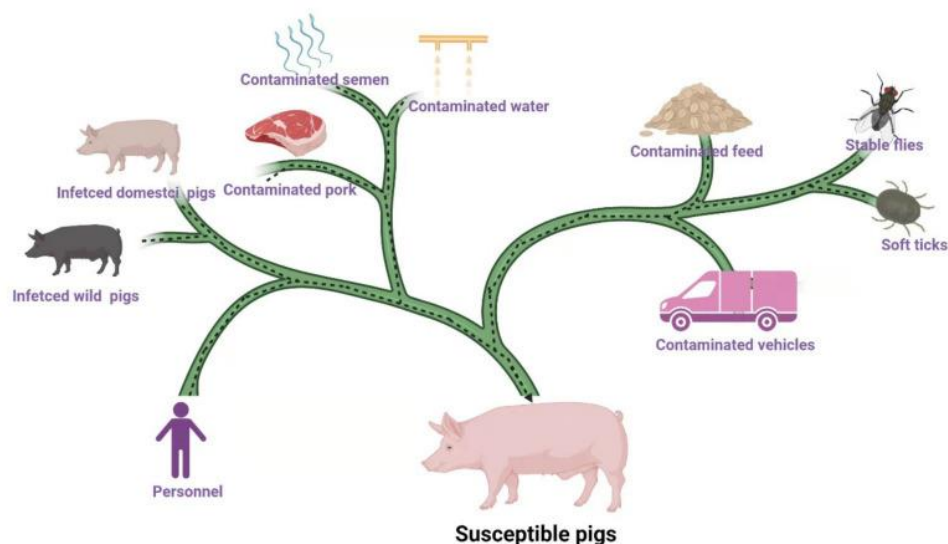
图 1-2 ASFV 传播情况^[18]

1.3 ASFV 传播方式

直接接触传播是 ASFV 主要的传播方式之一，传播 ASFV 的中间宿主和储存宿主大约有 8 个，其中软蜱是最重要的中间宿主。ASFV 感染软蜱可以在中肠上皮和唾液腺等器官复制，并长期存在。这使得感染 ASFV 的软蜱通过叮咬猪类长期传播病毒^[19,20]。除了软蜱，猪只本身也是 ASFV 长期存在的重要因素。猪感染中低等毒力的 ASFV 后，在恢复 6 个月后仍能排毒，从而不断感染健康猪^[21]，这种现象使得 ASFV 在猪群中传播持久并难以控制。

非接触传播也是传播 ASFV 的主要途径。研究统计，中国和俄罗斯地区的 100 例感染 ASFV 病例中，42%是污染的泔水喂养引起的，40%是受污染的人和交通工具引起的，16%是由感染的猪和产品引起的，2%是由野猪引起的。综上所述，饲喂带 ASFV 泔水是造成非直接传播的主要因素^[22]。因此，必须采取综合性的防控措施，防止病毒进一步扩散。

ASFV 具有顽强的生命力，在环境里很难消灭，这也是防控 ASFV 的难点。使用标准浓度的消毒液并维持一定时间，才能有效消毒 ASFV^[23]。例如，用 0.8% 的氢氧化钠、0.3% 的福尔马林和 1% 的氢氧化钙灭活 ASFV 需要 30 min，但是猪场环境复杂，环境中有多重蛋白质等活性物质^[24]。因此，在实际环境中，可能需要采用更高浓度的消毒液或更长的处理时间，以确保 ASFV 被彻底消灭。

图 1-3 ASFV 主要来源调查图^[25]

1.4 ASF 的诊断

不同亚型的 ASFV 有不同的临床症状,而且这些症状与其他猪类疾病存在相似之处,无法通过症状确定病原。且 ASFV 传播速度很快,一旦出现传染源,在短时间内会传播并感染整个猪群,所以建立快速、准确的检测方法对疾病的预防和流行具有重要意义。目前世界动物卫生组织(Office international des epizooties, OIE)推荐检测 ASFV 的方法主要有红细胞吸附检测、分子生物学、免疫学检测等。

1.4.1 红细胞吸附(HAD)实验

红细胞吸附(Hemadsorption, HAD)是 OIE 推荐的检测 ASF 权威方法^[26],通过观察 ASFV 感染细胞后吸附红细胞形成特定形态的现象来检测病毒的存在。具体来说,从患病动物体内分离出 ASFV 病料,将病料接种在细胞上,因为 ASFV 中 CD2v 具有吸附红细胞的特性,因此添加的红细胞会吸附在感染了 ASFV 的细胞表面,形成类似“玫瑰花环”或“桑葚”状现象。然而,小部分 ASFV 对红细胞不产生吸附现象,因此用此种方法鉴定时还需其他方法同步验证,以确保结果的准确性。此外, HAD 还存在一些局限性。首先,实验过程要等待数天才能对结果进行判定,无法快速诊断。而且,实验过程必须在 ABSL-3 实验室进行,这增加了操作的复杂性和成本,使得在大规模检测中难以应用^[27, 28]。

1.4.2 分子生物学检测

核酸检测 ASFV 具有速度快、特异性强,便于大规模检测的特点,在 ASFV 的检测中发挥着重要作用。核酸检测分为 PCR 和实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR),两种方法均针对 ASFV 的 B646L (p72 蛋白)保守区进行设计^[29, 30],与传统 PCR 相比,qRT-PCR 相比具有更强的特异性。OIE 对于 qRT-PCR 检测 ASFV 的方法推荐使用 TaqMan 探针和通用探针库(MLP)探针,这些方法能够在动物发病时检测到多种 ASFV 基因型^[31]。TaqMan 探针因其高特异性和不易产生分子污染的特点而被广泛使用,King 等人选择 ASFV 的 p72 为模板,建立 qRT-PCR 方法,应用 TaqMan 探针检测,可检测 40 copies/ μ L 的质粒。而 Fernández-Plinero 等人以 p72 为模板,开发了商业通用探针库(UPL),检测灵敏度小于 18 个 DNA 拷贝数,适用于低病毒血症的动物或病毒保存不良的样品的检测^[32, 33]。由于 qRT-PCR 检测灵敏度更高,完成扩增后不用开盖,直接读取荧光值即可对结果进行判定,避免了核酸对实验的影响,是检测 ASFV 良好的方法。

1.4.3 酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),是将检测抗体的抗原包被酶标板上,与标记的 ASFV 反应,从而实现对病毒的检测。此方法重复性好,能够检测 50-500 HAD50/mL 的抗原浓度^[34]。而且价格相对便宜,操作简便,非常适合大规模检测。在前面研究基础上,Sastre 等人基于 ASFV p72 单克隆抗体,发明一种检测抗原的侧向流通法,对感染动物和血液进行测试,发现能检测到 10^4 的病毒载量^[34]。Xu 等人发明一种免疫层析试纸条方法,检测样品结果良好^[35],这些方法在测试中表现出了良好的检测效果和高特异性,为 ASFV 的检测提供了新的方向。

1.5 ASF 疫苗

ASFV 已经存在超过一个世纪,由于其特殊的感染嗜性及复杂的结构,至今仍未有较为有效的疫苗问世。ASFV 的基因数庞大,遗传多样性显著,以及免疫逃避机制不确定,为疫苗的研发带来了严峻的挑战。近年来,研究 ASF 疫苗的

主要方向涵盖了灭活疫苗、减毒活疫苗、活载体疫苗等。部分 ASF 疫苗已经进入或即将进入临床检测阶段,应用前景较为乐观。但是在疫苗安全性和有效性方面,仍面临许多问题。

1.5.1 灭活疫苗

灭活疫苗是通过物理或化学方法将病原灭活使其丧失传染性,但保留抗原性所制成的疫苗。目前研究发现,ASF 灭活疫苗虽然能在免疫猪体内产生比较高的效价,但是不能产生有效保护作用^[36,37]。2014 年 Blome 等人将 ASFV 灭活后利用佐剂 PolygenTM 和 EmuLsigen-D 对断奶猪进行两次免疫,第一次免疫 6 周后检测到较高的抗体效价,使用同源 ASFV 毒株攻毒后未观察到有效的保护作用^[38]。ASFV 保护性免疫需要体液和细胞免疫共同参与,虽然中和抗体能保护被强毒攻击的动物,但是不能提供完全的保护,而且细胞免疫更为重要^[39]。灭活疫苗虽然具有较强的抗原性,但缺乏刺激机体产生完整细胞免疫应答的能力,所以目前灭活疫苗难以防控 ASFV 流行^[8]。

1.5.2 减毒活疫苗

ASF 减毒活疫苗通常是通过缺失或突变 ASFV 毒力基因,使病毒致病能力降低,但是保留其抗原性的一类疫苗,主要包括天然和人工减毒活疫苗。King 等人采用了一种基于葡萄牙非毒性基因型 I (OURT88/3) 分离株进行实验,免疫猪可以完全免疫来自 ASFV Ben971 和 Mganda 1965 (X 型) 的攻击,而且证明来自不同 ASFV 刺激物可以刺激机体产生较高的 IFN- γ 并且产生不同毒株的交叉保护力^[40]。人工减毒活疫苗选择靶基因至关重要,往往需要考虑免疫的安全性,同时也要考虑保护的适宜性。Liu 等人以 ASFV 中国株 (GZ201801) 为基础,基于 I177L 基因的 5 个基因缺失的 ASFV 在猪体内有过短暂的体温升高和病毒血症,不能转化为强毒毒株,并对强毒亲本病毒的攻击具有完全免疫力^[41]。格鲁吉亚共和国强毒 ASFV 在 Vero 细胞中连续传代 110 次,ASFV 在 Vero 细胞中传代不断增加,但是随着传代次数增加,在体内观察到的毒力逐渐减少,在 110 代观察到毒力完全消失,对亲本毒无保护作用。在病毒的全基因序列分析显示基因组的左右末端的特定区域积累了较多缺失,也观察到氨基酸取代和移码突变现象,这些

可能是病毒逐渐消失的重要原因^[42]。虽然减毒活疫苗具有良好的免疫原性并且保护率较高,但是往往伴随一些副作用,如出现关节肿胀和病毒血症,并且可能恢复毒性。还有一个因素是缺乏稳定的传代细胞系,这些缺点限制了现阶段减毒活疫苗的使用。

1.5.3 活载体疫苗

常用活载体疫苗包括痘病毒载体疫苗、腺病毒载体疫苗等。其中,腺病毒载体疫苗有着稳定性好、宿主范围广、安全性高等优势,应用最为广泛。其原理是是将保护性抗原构建在腺病毒上,将腺病毒转移至动物机体,腺病毒在动物体内持续表达目的蛋白,机体免疫系统从而识别相应的抗原蛋白,并触发相应的免疫应答。Estefanía等人选择 35 种ASFV抗原,利用腺病毒对野猪进行免疫,进行攻毒保护实验(ASFV Arm07)。结果发现,腺病毒诱导机体产生强烈的免疫反应,这些反应有效地清除了部分ASFV的感染,但是均表现出非洲猪瘟的临床症状和病理变化^[43]。Goatley筛选出 8 个ASFV保护性抗原,分别运用腺病毒和牛痘载体构建重组病毒免疫试验猪,并运用ASFV(OUR T88/1)进行攻毒保护测试,结果发现所有试验猪虽然出现ASF临床症状但是均可以存活^[44]。Lokhandwala等人用 12 种ASFV保护性抗原,虽然能诱导机体产生较高的特异性抗体,但是动物接种病毒(ASFV Georgia)后,其存活率却相对较低^[45]。现阶段,腺病毒疫苗在针对ASFV保护性免疫上取得了一些进展,从哺乳动物细胞中纯化得到疫苗抗原,能够诱导机体产生良好的特异性抗体和T细胞应答,从而展现出一定的保护效果。然而,要完全清除机体内ASFV感染并阻止动物传播病毒,仍需要进一步的研究和探索。

1.6 ASFV 培养用细胞

1.6.1 猪肺泡巨噬细胞

猪肺泡巨噬细胞(Porcine alveolar macrophages, PAM),通常是利用 PBS 对猪肺部进行灌洗,从而提取得到的细胞。1982 年, Carrascosa 通过参考兔肺泡巨噬细胞的分离方法成功分离出 PAM,并且证明 ASFV 可在 PAM 上生长^[46]。这种方法能够有效地分离和收集猪肺部的细胞,为后续的实验研究提供了可靠的细胞来源。通过专业操作和优化实验条件,我们可以确保 PAM 细胞的纯度和活性,

以满足各种科学研究的需求。此外，PAM 在完成制作后具有长期冷冻保存的能力，这一特性使得 PAM 能够在需要时随时复苏并用于 ASFV 的扩增，并且保持正常的生物活性和功能^[40, 47]。

1.6.2 猪骨髓单核细胞和巨噬细胞

猪骨髓单核细胞 (Porcine bone marrow monocytes cell, PBMC)，是取猪肋骨或者股骨中的一类骨髓单核细胞。1960 年，Malmquist 等首次在 PBMC 上成功繁殖 ASFV，且无需适应可以立即感染^[48]。但是文献报道，骨髓细胞和新鲜血液单核细胞对 ASFV 体外感染的易感程度较低，骨髓巨噬细胞(BMDM)相较于 PBMC 更容易感染 ASFV^[49]，BMDM 是 PBMC 通过特定刺激因子诱导分化所产生的一类细胞，通常，在 PBMC 的培养基中加入一定量的 L929 细胞上清液、GM-CSF 或 M-CSF 等刺激因子，经过 5 至 7 d 的诱导分化，即可将 PBMC 转化为 BMDM^[50]。

2 ASF 亚单位疫苗研究进展

亚单位疫苗是将已知的保护性抗原基因通过原核或真核载体系统表达相应蛋白，能够诱发机体产生免疫应答反应。相较于传统的灭活或减毒活疫苗，亚单位疫苗在安全性方面具有显著优势，且更易于实现大规模生产^[51]。但是亚单位疫苗免疫原性有限，需要配合合适的佐剂来增强抗原的免疫效力。此外，ASFV 病毒结构复杂，大部分抗原功能尚不清楚。因此，选择合适的保护性抗原、筛选疫苗递送载体和佐剂是研发 ASF 亚单位疫苗的方向。

2.1 ASFV 抗原研究进展

由于 ASFV 基因组庞大，编码大量蛋白，这些蛋白在病毒组装、DNA 复制、损伤修复等都发挥重要作用。基于 ASFV 的 p72 (B646L) 抗原进行序列分析，可将 ASFV 分为 24 种基因型^[52, 53]。另一方面，根据 ASFV 的 CD2v 和 C 型凝集素蛋白基因位点介导的 HAI 血清学特性，ASFV 又被进一步分为 8 个血清型^[54]。尽管现阶段已经对部分 ASFV 抗原有了一定的了解，但仍有大量抗原的功能尚属未知。筛选高效的保护性抗原对于 ASF 疫苗的研发至关重要。在此，总结了

部分 ASFV 抗原，并简要介绍它们的功能。

ASFV 抗原 I177L、A151R、F317L 能为宿主提供保护效果，都是病毒的毒力基因^[55-57]。首先，I177L 是一种毒力相关基因，编码 177 个氨基酸，是首个能完全产生无排毒反应的疫苗株^[55]。通过免疫缺失该基因的 ASFV 的疫苗，试验猪产生了极高水平的 IFN- β ，并且对母本毒株具有完全的保护能力。并且，缺失 I177L 基因的 ASFV 能够在原代 BMDM 细胞中显著降低了病毒的复制能力^[41]，使得其在疫苗研发中展出独特的潜力。其次，A151R 基因编码一种非结构蛋白，尽管并不直接参与构成病毒粒子，但在病毒复制和组装过程中通常发挥重要的调控功能。一项研究表明，在 Vero 细胞上使用 siRNA 抑制 A151R 转录，可导致细胞病变（Cytopathic effect, CPE）和病毒滴度显著降低，这表明 A151R 蛋白对病毒复制至关重要^[56]。A151R 与非结构蛋白 B119L 相互作用，作为氧化还原电位还原途径的一部分，负责形成 E248R 蛋白的二硫键，E248R 蛋白对于成熟病毒粒子的正确组装至关重要，这意味 A151R 通过影响 E248R 的功能，间接地参与了病毒粒子的组装过程^[58]。最后，F317L 由 pF317L 编码，其分子量约为 35.18 kDa，这种蛋白质在宿主先天免疫反应中发挥着拮抗作用，降低 F317L 表达可明显抑制 ASFV 复制。Jancovich 等人研究发现，F317L 虽然产生体液免疫反应相对较低，但是能诱导较高的细胞免疫应答^[57]。

E199L、I73R、p37 在病毒早期复制中起到关键作用，是病毒重要的结构蛋白^[2, 59, 60]。首先，I73R 是 ASFV 复制周期的早期病毒基因，其编码的蛋白是一种具有 Z α 结构域的核酸结合蛋白。这种蛋白在病毒感染早期定位于细胞核，通过抑制细胞核中细胞 mRNA 的输出，广泛抑制宿主抗病毒蛋白的合成。具体来说，I73R 蛋白的核酸结合特性使其能够阻止宿主高 GC 成分的 mRNA 出核，从而有效地阻断宿主抗病毒反应。基于 I73R 的这些特性，它被视为病毒衰减的潜在靶标^[2]。其次，p37 是 ASFV 中由 CP2475L 基因编码的 pp220 蛋白的一部分，它在维持病毒结构的完整性方面起着至关重要的作用。这种多蛋白被加工成 p5、p34、p14、p37 和 p150 单个蛋白，用腺病毒表达后使用“鸡尾酒”式免疫试验猪，诱导机体产生显著的 IgG、IFN- γ ，并且分泌细胞毒性 T 淋巴细胞反应^[61]。最后，pE199L 是由 E199L 基因编码，其分子量大约 22 kDa，属于 I 类跨膜蛋白。研究显示，它与内体蛋白（NPC1）和溶酶体膜蛋白（Lamp）存在相互作用。这些

相互作用在 ASFV 的感染周期中起到了重要的调节作用，特别是与胆固醇的代谢密切相关^[62]。另外 E199L 还可以下调 PYCR2 的表达水平，促进细胞自噬^[63]。

M448R 与 C129R 与宿主免疫逃逸有关，并且能够影响机体细胞免疫。M448R 是唯一能够诱导的 ASFV 特异性 T 细胞混杂识别的蛋白，该蛋白具备 RNA 连接酶活性，这一特性使其在 tRNA 修复过程中发挥关键作用^[64]。利用这一功能，M448R 能够绕过与病毒感染相关受损的 RNA 引发的免疫反应，进而促进宿主免疫逃避^[65, 66]。C129R 具有核酸酶的特性，在 ASFV 感染宿主细胞的过程中，C129R 蛋白通过与细胞中的 2',3'-cGAMP 相互作用，利用其磷酸二酯酶的活性裂解 2',3'-cGAMP 信号分子。这一机制能够抑制宿主抗病毒先天反应过程中的 IFN 信号通路，从而帮助 ASFV 逃逸宿主的抗病毒先天免疫应答^[67]。

E146L、MGF110-5L-6L 与其他 9 个抗原可被免疫猪的淋巴细胞识别。对试验猪进行免疫后，发这些蛋白能够显著增强 IFN- γ 分泌，并且其他细胞因子介导的 ASFV 特异性细胞毒性淋巴细胞也有显著升高。当这些试验猪受到强毒攻击后，临床症状减轻并且病毒血症水平的降低^[68]，揭示了这些抗原蛋白对 ASFV 具有保护性作用。

2.2 佐剂研究进展

前期研究中发现，热应激蛋白 70c (Heat shock protein, Hsp70c) 能显著激发机体产生较强的免疫应答，具有良好的应用潜力^[69]。Hsp70c 通过 TLR2、TLR4 刺激抗原递呈细胞的产生，并促进细胞毒性 T 淋巴细胞的活化，诱导机体产生天然和获得性免疫^[70]。因此，Hsp70c 能在免疫调节中扮演着关键角色，为疫苗设计和免疫治疗等领域提供了新的思路和策略。

通过与抗原偶联或者混合免疫的方式，Hsp70c 能够显著刺激机体产生体液和细胞免疫反应^[71]。通过免疫人和小鼠鼻腔^[72]或者阴道^[73]，发现还能产生黏膜免疫。此外，将抗原与 Hsp70c 融合表达后用于免疫，能够刺激机体生成 CTL (特异性细胞毒性 T 淋巴细胞)^[74]，与未融合表达 Hsp70c 的对照组相比，免疫组的 GRP60 的 IgG 提高 10 倍^[75]。

Park 等人用大肠杆菌中载体表达了 Hsp70c，配合减毒的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 疫苗对试

验猪进行皮内接种，在接种 4 周后接种异源毒株，这种联合免疫方法对异源毒株攻击具有良好的保护作用，且尸检无临床症状，无病理病变。此外，这种方法还显著提高了血清中特异性抗体和细胞因子 IFN- γ 的水平，显著减少了肺部的病理病变和病毒载量^[76]。

卢会鹏等人在腺病毒载体基础上，选择 ASFV 抗原 CD2v、p30、p54 与佐剂 Hsp70c 融合表达，通过对试验猪进行鼻腔喷雾免疫发现，免疫试验猪 7 天后能检测到明显的体液免疫，二免后抗体水平显著提高，表明抗体具有免疫记忆性和特异性。通过检测试验猪气管漂洗液和肺泡灌洗液，发现免疫后 35 天产生了较高水平的黏膜免疫^[77]。

鉴于 ASFV 保护性免疫需要体液免疫和细胞免疫的共同参与，且细胞免疫更为关键。以上研究充分表明，Hsp70c 能够诱导机体产生良好的体液和细胞免疫，并在鼻腔免疫时具有诱导黏膜免疫的能力。因此，Hsp70c 是一种极具潜力的分子佐剂。

2.3 ASF 亚单位疫苗的应用

单一的 ASFV 抗原诱导机体产生的免疫效果往往有限，而将多种 ASFV 抗原组合，可以显著增强体液和细胞免疫应答，进而诱导机体产生更好的免疫效果。因此，ASF 亚单位疫苗研究的方向便是筛选合适的抗原组合，并配合高效的佐剂来增强疫苗的免疫原性。

Zhang 等人用大肠杆菌载体，选择 6 个 ASFV 抗原配合佐剂，以鸡尾酒式混合免疫试验猪，结果发现免疫猪血清能够检测到较高的 IgG，并且激活特异性 T 细胞，与阴性对照组相比产生更高的 IFN- γ 。在体外实验中，免疫猪的血清和 PBMCs 分别中和 ASFV 82.8%和 92.6%的感染^[78]，说明选择合适的抗原和佐剂制成的亚单位疫苗能诱导机体产生较高的体液和细胞免疫应答。

Gomez-Puertas 等人用杆状病毒表达 p54、p30 蛋白，组合免疫试验猪。结果显示试验猪产生了特异性抗体，免疫猪血清可以在 PAM 细胞上中和 ASFV。但是猪没有得到致命感染的保护，病程也没有改变，说明 ASFV 可能通过一些手段逃避单个附着蛋白的免疫反应^[79]，并且特异性抗体在免疫保护种仅仅起到补充作用，还需要 T 细胞介导的细胞免疫共同参与对 ASFV 的保护。

Burmakina 等人用 4 种 ASFV 质粒和 4 种 ASFV 重组抗原接种猪，三次免疫后用 ASFV（Armenia 2007）对猪进行攻毒保护实验。然而，实验结果显示，接种的抗原未展现出预期的保护作用。与未接种的对照组相比，接种组感染 ASFV 后更早地出现了临床症状，死亡时间也更为提前，同时病理反应也更为明显^[80]。虽然产生特异性抗体，但这些抗体并不具备中和病毒的能力。当非中和抗体存在时，所产生的病毒-抗体复合物仍具有传染性。并且复合物被巨噬细胞吞噬后，ASFV 会在巨噬细胞内持续繁殖，造成病毒在机体内快速扩散，加剧了病情的发展^[27]。

目前，筛选合适的保护性抗原、筛选疫苗递送载体和佐剂成为研发 ASF 亚单位疫苗待解决的问题。中国农业科学院兰州兽医研究所联合普莱柯和 BioNike 公司正在联合研发 ASF 亚单位疫苗，并已经进行免疫和攻毒保护实验，正在进行评估和申报，这可能是目前最接近临床应用的 ASF 亚单位疫苗^[81]。重组亚单位疫苗由于具有良好的免疫效果，对防治 ASFV 有着良好前景，具有重要的临床实用价值。

3 研究目的与意义

自从 2018 年 ASFV 传入我国，给养猪业造成巨大损失，然而，时至今日尚无有效防控 ASFV 的疫苗上市。疫苗免疫是控制传染病最有效的方法，因此研发出防控 ASFV 的疫苗迫在眉睫。多项研究证明，将多个具有良好抗原性的 ASFV 基于组合能获得更好的免疫应答效果，配合良好的佐剂，其安全性和保护力都优于传统灭活疫苗，是一个值得探索的方向。本研究使用大肠杆菌载体，选择组合抗原分别与分子佐剂进行融合表达，并将其免疫试验猪，对重组蛋白进行免疫效力评价，为后期研发 ASF 疫苗提供数据支持。

参考文献

- [1] K Stahl, S Sternberg-Lewerin, S Blome, et al. Lack of evidence for long term carriers of african swine fever virus - a systematic review [J]. *Virus Res*, 2019, 272: 197725.
- [2] Y Liu, Z Shen, Z Xie, et al. African swine fever virus I73R is a critical virulence-related gene: a potential target for attenuation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(15): e2210808120.
- [3] S Yang, C Miao, W Liu, et al. Structure and function of african swine fever virus proteins: current understanding [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1043129.
- [4] A Alejo, T Matamoros, M Guerra, et al. A proteomic atlas of the african swine fever virus particle [J]. *J Virol*, 2018, 92(23).
- [5] ML Salas, G Andres. African swine fever virus morphogenesis [J]. *Virus Res*, 2013, 173(1): 29-41.
- [6] G Andres, R Garcia-Escudero, E Vinuela, et al. African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity [J]. *J Virol*, 2001, 75(15): 6758-68.
- [7] 国师榜. 非洲猪瘟病毒的分离、生物学特性研究及抗病毒药物的筛选 [D]; 华中农业大学, 2023.
- [8] K Wu, J Liu, L Wang, et al. Current state of global african swine fever vaccine development under the prevalence and transmission of ASF in china [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(3).
- [9] C Alonso, M Borca, L Dixon, et al. ICTV virus taxonomy profile: asfarviridae [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(5): 613-4.
- [10] G Wang, M Xie, W Wu, et al. Structures and functional diversities of ASFV proteins [J]. *Viruses*, 2021, 13(11).
- [11] LK Dixon, K Stahl, F Jori, et al. African swine fever epidemiology and control [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2020, 8: 221-46.
- [12] W Plowright, J Parker, MA Peirce. African swine fever virus in ticks (*ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in tanzania [J]. *Nature*, 1969, 221(5185): 1071-3.

- [13] LK Mulumba-Mfummu, C Saegerman, LK Dixon, et al. African swine fever: update on eastern, central and southern africa [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(4): 1462-80.
- [14] A European Food Safety, J Cortinas Abrahantes, A Gogin, et al. Epidemiological analyses on african swine fever in the baltic countries and poland [J]. *EFSA J*, 2017, 15(3): e04732.
- [15] X Wen, X He, X Zhang, et al. Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of african swine fever virus in china in 2018 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 303-6.
- [16] G Lu, J Pan, G Zhang. African swine fever virus in asia: its rapid spread and potential threat to unaffected countries [J]. *J Infect*, 2020, 80(3): 350-71.
- [17] NN Gaudreault, DW Madden, WC Wilson, et al. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 215.
- [18] LK Dixon, H Sun, H Roberts. African swine fever [J]. *Antiviral Res*, 2019, 165: 34-41.
- [19] JM Rodriguez, R Garcia-Escudero, ML Salas, et al. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites [J]. *J Virol*, 2004, 78(8): 4299-1313.
- [20] G Cackett, D Matelska, M Sykora, et al. The african swine fever virus transcriptome [J]. *J Virol*, 2020, 94(9).
- [21] BN Patrick, EM Machuka, D Githae, et al. Evidence for the presence of african swine fever virus in apparently healthy pigs in south-kivu province of the democratic republic of congo [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108521.
- [22] V Friedrichs, D Reicks, T Hasenfuss, et al. Artificial insemination as an alternative transmission route for african swine fever virus [J]. *Pathogens*, 2022, 11(12).
- [23] SA Dee, FV Bauermann, MC Niederwerder, et al. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194509.
- [24] M Juskiewicz, M Walczak, G Wozniakowski. Characteristics of selected active

- substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV [J]. *J Vet Res*, 2019, 63(1): 17-25.
- [25] Y Liu, X Zhang, W Qi, et al. Prevention and control strategies of african swine fever and progress on pig farm repopulation in china [J]. *Viruses*, 2021, 13(12).
- [26] JM Sanchez-Vizcaino, L Mur, JC Gomez-Villamandos, et al. An update on the epidemiology and pathology of african swine fever [J]. *J Comp Pathol*, 2015, 152(1): 9-21.
- [27] CA Oura, L Edwards, CA Batten. Virological diagnosis of african swine fever-comparative study of available tests [J]. *Virus Res*, 2013, 173(1): 150-8.
- [28] P De Leon, MJ Bustos, AL Carrascosa. Laboratory methods to study african swine fever virus [J]. *Virus Res*, 2013, 173(1): 168-79.
- [29] JA Barasona, C Gallardo, E Cadenas-Fernandez, et al. First orai vaccination of eurasian wild boar against african swine fever virus genotype II [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 137.
- [30] KR Van Kampen, Z Shi, P Gao, et al. Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans [J]. *Vaccine*, 2005, 23(8): 1029-36.
- [31] M Agüero, J Fernandez, L Romero, et al. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of african swine fever virus in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 4431-4.
- [32] CS Lee, ES Bishop, R Zhang, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine [J]. *Genes Dis*, 2017, 4(2): 43-63.
- [33] SV Vemula, YS Ahi, AM Swaim, et al. Broadly protective adenovirus-based multivalent vaccines against highly pathogenic avian influenza viruses for pandemic preparedness [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62496.
- [34] RC Wardley, EM Abu Elzein, JR Crowther, et al. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of african swine fever virus antigen and antibody [J]. *J Hyg (Lond)*, 1979, 83(2): 363-9.
- [35] L Xu, C Cao, Z Yang, et al. Identification of a conservative site in the african swine fever virus p54 protein and its preliminary application in a serological

- p>assay [J]. J Vet Sci, 2022, 23(4): e55.
- [36] AJ Forman, RC Wardley, PJ Wilkinson. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of african swine fever virus [J]. Arch Virol, 1982, 74(2-3): 91-100.
- [37] SS Stone, WR Hess. Antibody response to inactivated preparations of african swine fever virus in pigs [J]. Am J Vet Res, 1967, 28(123): 475-81.
- [38] S Blome, C Gabriel, M Beer. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated african swine fever virus vaccine preparation [J]. Vaccine, 2014, 32(31): 3879-82.
- [39] HH Takamatsu, MS Denyer, A Lacasta, et al. Cellular immunity in ASFV responses [J]. Virus Res, 2013, 173(1): 110-21.
- [40] K King, D Chapman, JM Argilaguuet, et al. Protection of european domestic pigs from virulent african isolates of african swine fever virus by experimental immunisation [J]. Vaccine, 2011, 29(28): 4593-600.
- [41] Y Liu, Z Xie, Y Li, et al. Evaluation of an I177L gene-based five-gene-deleted african swine fever virus as a live attenuated vaccine in pigs [J]. Emerg Microbes Infect, 2023, 12(1): 2148560.
- [42] PW Krug, LG Holinka, V O'donnell, et al. The progressive adaptation of a georgian isolate of african swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome [J]. J Virol, 2015, 89(4): 2324-32.
- [43] E Cadenas-Fernandez, JM Sanchez-Vizcaino, A Kosowska, et al. Adenovirus-vectored african swine fever virus antigens cocktail is not protective against virulent arm07 isolate in eurasian wild boar [J]. Pathogens, 2020, 9(3).
- [44] LC Goatley, AL Reis, R Portugal, et al. A pool of eight virally vectored african swine fever antigens protect pigs against fatal disease [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(2).
- [45] S Lokhandwala, V Petrovan, L Popescu, et al. Adenovirus-vectored african swine fever virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with georgia 2007/1 isolate [J]. Vet Microbiol, 2019, 235: 10-20.

- [46] QN Myrvik, ES Leake, S Oshima. A study of macrophages and epitheloid-like cells from granulomatous (BCG-induced) lungs of rabbits [J]. *J Immunol*, 1962, 89: 745-51.
- [47] AL Carrascosa, JF Santaren, E Vinuela. Production and titration of african swine fever virus in porcine alveolar macrophages [J]. *J Virol Methods*, 1982, 3(6): 303-10.
- [48] WA Malmquist, D Hay. Hemadsorption and cytopathic effect produced by african swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures [J]. *Am J Vet Res*, 1960, 21: 104-8.
- [49] C Sanchez-Torres, P Gomez-Puertas, M Gomez-Del-Moral, et al. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to african swine fever infection [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(12): 2307-23.
- [50] 莫绍江. 非洲猪瘟病毒在猪骨髓巨噬细胞的培养工艺及应用 [D]; 塔里木大学, 2024.
- [51] S Lee, MT Nguyen. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases [J]. *Immune Netw*, 2015, 15(2): 51-7.
- [52] CJ Quembo, F Jori, W Vosloo, et al. Genetic characterization of african swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in mozambique and identification of a novel genotype [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(2): 420-31.
- [53] A Malogolovkin, G Burmakina, ER Tulman, et al. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 4): 866-73.
- [54] JE Achenbach, C Gallardo, E Nieto-Pelegrin, et al. Identification of a new genotype of african swine fever virus in domestic pigs from ethiopia [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(5): 1393-404.
- [55] MV Borca, E Ramirez-Medina, E Silva, et al. Development of a highly effective african swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain [J]. *J Virol*, 2020, 94(7).
- [56] D Keita, L Heath, E Albina. Control of African swine fever virus replication by small interfering RNA targeting the A151R and VP72 genes [J]. *Antivir Ther*,

- 2010, 15(5): 727-36.
- [57] JK Jancovich, D Chapman, DT Hansen, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank african swine fever virus immunogenic and protective proteins [J]. J Virol, 2018, 92(8).
- [58] I Rodriguez, M Redrejo-Rodriguez, JM Rodriguez, et al. African swine fever virus pB119L protein is a flavin adenine dinucleotide-linked sulfhydryl oxidase [J]. J Virol, 2006, 80(7): 3157-66.
- [59] T Matamoros, A Alejo, JM Rodriguez, et al. African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration [J]. mBio, 2020, 11(4).
- [60] A Eulalio, I Nunes-Correia, J Salas, et al. African swine fever virus p37 structural protein is localized in nuclear foci containing the viral DNA at early post-infection times [J]. Virus Res, 2007, 130(1-2): 18-27.
- [61] MD Zajac, N Sangewar, S Lokhandwala, et al. Adenovirus-vectored african swine fever virus pp220 induces robust antibody, IFN-gamma, and CTL responses in pigs [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 921481.
- [62] MA Cuesta-Geijo, I Garcia-Dorival, A Del Puerto, et al. New insights into the role of endosomal proteins for african swine fever virus infection [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(1): e1009784.
- [63] S Chen, X Zhang, Y Nie, et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2 [J]. Virol Sin, 2021, 36(2): 196-206.
- [64] R Silber, VG Malathi, J Hurwitz. Purification and properties of bacteriophage t4-induced RNA ligase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972, 69(10): 3009-13.
- [65] M Amitsur, R Levitz, G Kaufmann. Bacteriophage t4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA [J]. EMBO J, 1987, 6(8): 2499-503.
- [66] A Martins, S Shuman. Characterization of a baculovirus enzyme with RNA ligase, polynucleotide 5'-kinase, and polynucleotide 3'-phosphatase activities [J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18220-31.
- [67] N Dodantenna, L Ranathunga, WaG Chathuranga, et al. African swine fever

- virus EP364R and C129R target cyclic GMP-AMP to inhibit the cGAS-STING signaling pathway [J]. *J Virol*, 2022, 96(15): e0102222.
- [68] CL Netherton, LC Goatley, AL Reis, et al. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1318.
- [69] Y Bulut, KS Michelsen, L Hayrapetian, et al. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 20961-7.
- [70] CA Colaco, CR Bailey, KB Walker, et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 461230.
- [71] R Perraut, AR Lussow, S Gavoille, et al. Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants [J]. *Clin Exp Immunol*, 1993, 93(3): 382-6.
- [72] CD Pack, M Gierynska, BT Rouse. An intranasal heat shock protein based vaccination strategy confers protection against mucosal challenge with herpes simplex virus [J]. *Hum Vaccin*, 2008, 4(5): 360-4.
- [73] DJ Lewis, Y Wang, Z Huo, et al. Effect of vaginal immunization with HIVgp140 and HSP70 on HIV-1 replication and innate and T cell adaptive immunity in women [J]. *J Virol*, 2014, 88(20): 11648-57.
- [74] Q Huang, JF Richmond, K Suzue, et al. In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(2): 403-8.
- [75] L Yong, Z Huiyong, H Jing, et al. Vaccination with a potent DNA vaccine targeting B-cell epitopes of hGRP induces prophylactic and therapeutic antitumor activity in vivo [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(4): 459-68.
- [76] C Park, MS Lee, JH Baek, et al. Intradermal co-inoculation of codon pair deoptimization (CPD)-attenuated chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with toll like receptor (TLR) agonists enhanced the protective effects in pigs against heterologous challenge [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 256: 109048.
- [77] 卢会鹏. 3 种 TLR 激动剂的免疫佐剂活性比较研究 [D]; 扬州大学.

- [78] G Zhang, W Liu, S Yang, et al. Evaluation of humoral and cellular immune responses induced by a cocktail of recombinant african swine fever virus antigens fused with opri in domestic pigs [J]. *Virol J*, 2023, 20(1): 104.
- [79] P Gomez-Puertas, F Rodriguez, JM Oviedo, et al. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response [J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-71.
- [80] SY Sunwoo, D Perez-Nunez, I Morozov, et al. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with african swine fever virus armenia 2007 strain [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7(1).
- [81] 李辉. 表达 ASFV 保护性抗原重组腺病毒的构建及其在猪体内的免疫效果研究 [D]; 扬州大学, 2024.

第一章 ASFV 重组抗原的原核表达和纯化

自 2018 年 ASF 在中国沈阳爆发,随后在其他省份相继蔓延,由于无有效防控手段,ASF 的发生给我国养猪业造成了毁灭性的打击。因此,研制出高效、安全的 ASF 疫苗迫在眉睫。以大肠杆菌为载体的亚单位疫苗因其良好的安全性、较强的免疫原性以及较低的成本,可以大规模量产重组蛋白,为防控 ASF 提供了有力的技术支撑。前期研究发现,ASFV 单一的抗原产生的保护能力十分有限,难以提供全面有效的防护。然而,多种抗原组合能够产生较高的体液免疫和细胞免疫应答,能诱导更好的保护性效果。所以选择合适的抗原和佐剂作是 ASF 亚单位疫苗的研究方向。有研究报道,ASFV 的 I177L、A151R、F317L 能为宿主提供保护效果,都是病毒的毒力基因,对病毒的致病性起到关键作用^[1-3]。E199L、I73R、p37 在病毒早期复制中起到关键作用,是病毒重要的结构蛋白,对维持病毒的完整性和感染力至关重要^[4-6]。M448R 与 C129R 与宿主免疫逃逸有关,它们能够影响机体的细胞免疫反应,使病毒能够在宿主体内逃逸免疫系统的清除^[7,8]。MGF110-5L、I125L、E146L 具有增强机体细胞免疫的能力,并且试验猪被强毒攻击后能够减轻临床症状^[9]。前期研究发现,抗原与 Hsp70c 融合表达可以诱导机体产生较高的体液和细胞免疫应答^[10,11],能够显著促进亚单位疫苗的体液与细胞免疫效果^[12]。本研究运用大肠杆菌载体表达了 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5),经 NI-NTA 亲和层析法纯化重组蛋白制备亚单位疫苗,用于后续的免疫试验。

1 材料

1.1 载体、菌株

按照原核表达密码子优化的多个基因片段: M448R-I73R、p37-I177L、MGF110-4L-MGF110-5L-I125L、A151R-CP129R-E146L、E199L-F317L(去跨膜)由上海生工生物公司全基因合成。

pET-30a (+) 空载、*E. coli* DH5 α (T1)、*E. coli* BL21 (DE3)、Hsp70 DNA 均由本实验室保存,ASFV 灭活阳性血清来自扬州大学 ASF 研究所。

1.2 实验试剂和试剂盒

表 1-1 主要试剂和试剂盒
Table 1-1 The main reagents and kits

主要试剂和试剂盒	公司
DNA marker	大连 TaKaRa 公司
Yeast Extract、Tryptone	英国 OXOID 公司
2×Taq Plus Master Mix、 Protein marker	南京诺唯赞生物科技有限公司
纯化琼脂粉	上海中科昆虫生物技术有限公司
AgaroseG-10	法国 BIOWEST 公司
Goodview Nucleic Acid Stain	北京赛百盛基因技术有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
无水乙醇	上海国药试剂集团
丙烯酰胺、IPTG、脱脂奶 粉、SDS 试剂	生工生物工程（上海）股份有限公司
质粒提取试剂盒、限制性 内切酶	北京全式金生物有限公司
Ni-NTA 亲和层析介质	南京金斯瑞生物科技有限公司
通用型 ECL 发光底物	苏州新赛美生物科技有限公司

1.3 仪器设备

表 1-2 主要仪器设备
Table 1-2 The main instruments and equipments

仪器设备（型号）	公司
自动高压锅（SX-500）	日本 TOMY 公司
微型瞬时离心机（D1008E）	北京大龙兴创仪器北京公司
PCR 仪（6321）	德国 Eppendorf 公司
高速冷冻离心机（581R）	德国 Eppendorf 公司
凝胶成像系统（Gel Doc XR+）	英国 Syngene 公司
振荡培养箱（ZQZY-AS）	上海知楚仪器有限公司
涡旋振荡仪（Vortec-5）	美国 Scientific Industries 公司
隔水式电热恒温培养箱 （DNP9272）	上海精宏试验设备有限公司
琼脂糖水平电泳仪（HE-120）	北京市六一仪器厂
超声破碎仪（VCX-130）	美国 SNOICS 公司

仪器设备（型号）	公司
酸度计（S210）	梅特勒-托利多仪器（上海）公司
电子分析天平（BS-224-S）	上海越平科学仪器有限公司
制冰机（AF80AS）	美国 Scotsman 公司
超纯水仪（Milli-Q Reference）	德国 Millipore 公司
核酸蛋白测定仪（nanodrop2000）	美国 Thermo Scientific 公司
磁力搅拌器（HJ-1）	金坛市医疗仪器厂
脱色摇床（NSP-300）	泰州诺米医疗科技有限公司

1.4 所需溶液配制

（1）液体 LB 培养基：称取 10.0 g Tryptone、5.0 g Yeast Extract、10.0 g NaCl，溶解于超纯水中，定容至 1 L，121℃高压灭菌后，4℃保存。

（2）固体 LB 培养基：称取 10.0 g Tryptone、5.0 g Yeast Extract、10.0 g NaCl、15.0 g 纯化琼脂粉，溶解于超纯水中，充分溶解后定容至 1 L。121℃高压灭菌后，固体培养基冷却至 45℃左右时，加入对应浓度的抗生素（卡那霉素为 50 μg/mL），摇晃混匀后立即倒入灭菌的平皿中，待凝固后 4℃保存。

（3）卡那霉素储存液（10 mg/mL）：称取 0.1 g 卡那霉素粉末，溶解于 10 mL 超纯水中，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装后-20℃保存。

（4）20% IPTG 储存液：称取 4.0 g IPTG 粉末溶解于 20 mL 超纯水中，搅拌混匀后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装后-20℃保存。

（5）磷酸盐缓冲液（PBS）：称取 NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄ 3.58 g、KH₂PO₄ 0.27 g、KCl 0.2 g 加入 800 mL 超纯水中，定容至 1 L 并搅拌均匀，室温保存。

（6）PBST：吸取 500 μL Tween 20 加入 1 L PBS 中，充分混匀后室温保存。

（7）Western blot 相关溶液

Running Buffer：称取 18.8 g Glycine、3.02 g Tris、1.0 g SDS 溶解于超纯水中，定容至 1 L。

转印缓冲剂：称取 11.26 g Glycine、2.42 g Tris、1.0 g SDS 充分溶解于 800 mL 超纯水中，在使用之前加入 200 mL 甲醇定容至 1 L。

10%过硫酸铵（APS）：称取 0.1 g 过硫酸铵加入 10 mL 超纯水中，充分混匀后分装至-20℃保存。

2 方法

2.1 引物的设计与合成

根据 NCBI 公布的 *HSP70c* 基因的核苷酸序列, 利用 Primer Primer5 软件, 参照载体的酶切位点, 在 *Hsp70c* 上游引物中插入 *Hind* III 酶切位点, 在下游引物中加入 *Xho* I 酶切位点, 将 *Hsp70c* 端 267 个氨基酸 (28kDa) 和组氨酸标签编码序列插入表达载体。全基因合成的组合抗原在前端有 *Bam*HI 在后端有 *Hind* III 酶切位点, 然后将抗原基因克隆在 *Hsp70* 的上游 (N 端融合), 表达的融合蛋白用镍离子亲和层析柱纯化。

表 1-3 引物序列

Table 1-3 Primer sequence for PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
<i>Hsp70</i> F	CCCAAGCTTGAAGTTAAAGACGTTCTGCTGCT
<i>Hsp70</i> R	CCGCTCGAGTTTAGCTTCACGACCGTCGT
T7 F	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

2.2 重组载体的构建

2.2.1 目的片段的 PCR 扩增及回收

以实验室保存 *Hsp70* 质粒为 DNA 模板, 用上述合成的特异性引物扩增目的片段, PCR 扩增体系如下 (20 μ L):

表 1-4 PCR 反应体系

Table 1-4 PCR reaction system

反应成分	体积
Phanta Master Mix	15.0 μ L
<i>Hsp70</i> F	1.0 μ L
<i>Hsp70</i> R	1.0 μ L
<i>Hsp70</i>	1.0 μ L
ddH ₂ O	up to 25.0 μ L

PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 15 s; 60°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min, 变性到延伸一共进行 35 个循环; 72°C 再延伸 10 min, 最后产物 4°C

保存。

电泳结束后，目的条带用 AXYGEN 公司的胶回收试剂盒进行胶回收，具体步骤如下：

(1) 将阳性条带的胶块切割下来放进 1.5 mL 指型管中，加入 500 μ L DEA 溶液。放到 75°C 金属浴融化胶块 10 min。

(2) 加入 250 μ L DEB 溶液，反复吹打混匀。

(3) 将混合液加入 cp3 吸附柱，静置 1 min，12000 g 离心 1 min 后弃滤液。

(4) 加入吸附柱 500 μ L W1 溶液，12000 g 离心 30 s 后弃滤液。

(5) 加入吸附柱 700 μ L W2 溶液，12000 g 离心 1 min 后弃滤液并重复步骤。

(6) 12000 g 空离 1 min 后弃滤液。

(7) 打开盖子散发乙醇 5 min，并将吸附柱放入干净的指型管中。

(8) 吸附柱加入 25 μ L Eluent 去离子水，静置 1 min，12000 g 离心 1 min 后收集产物。用核酸蛋白测定仪测定回收产物浓度，并将产物保存在 -20°C 备用。

2.2.2 片段和载体双酶切及连接

用 *Hind* III 和 *Xho* I 对回收的目的片段和 pET-30a 空载进行双酶切，目的片段在 37°C 的水浴锅中酶切 20 min，载体酶切 20 min，酶切体系如下：

表 1-5 酶切反应体系
Table 1-5 Eazyme digestion system

反应成分	体积
目的基因/载体	1.0 μ g
10×Loading Buffer	2.0 μ L
<i>Hind</i> III	1.0 μ L
<i>Xho</i> I	1.0 μ L
ddH ₂ O	up to 20.0 μ L

酶切结束后，用 OMEGA 公司的核酸产物清洁回收试剂盒进行回收，具体步骤如下：

(1) 将酶切产物转移到一个 1.5 mL 指型管中，加入 4 倍体积的 CP Buffer，混合均匀后加入至试剂盒中 HiBind DNA Mini Columns 中，13000 g 离心 1 min 后弃滤液。

(2) 加入 700 μL DNA Wash Buffer, 13000 g 离心 1 min 后弃滤液并重复。

(3) 12000 g 离心 1 min 彻底清除 DNA Wash Buffer 后弃滤液。

(4) 开盖静置 5 min, 散发乙醇。

(5) 加入 25 μL Elution Buffer 静置 1 min, 13000 g 离心 1 min 后收集产物。

将酶切后回收的目的片段与载体按照摩尔比 3:1 进行连接, 连接条件为 16 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴过夜, 连接体系如下:

表 1-6 连接反应体系
Table 1-6 Ligation reaction system

反应成分	体积
10 \times T4 DNA Buffer	2.0 μL
T4 DNA 连接酶	1.0 μL
线性化 pET30a	2.0 μL
Hsp70 回收片段	6.0 μL
ddH ₂ O	up to 20.0 μL

2.2.3 载体双酶切及连接

用 *Bam*HI 和 *Hind* III 对回收的目的片段和 pET30-Hsp70c 载体进行双酶切, 目的片段在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中酶切 30 min, 载体酶切 30 min, 酶切体系如下:

表 1-7 酶切反应体系
Table 1-7 Eazyme digestion system

反应成分	体积
目的基因/载体	1.0 μg
10 \times Loading Buffer	2.0 μL
<i>Bam</i> H I	1.0 μL
<i>Hind</i> III	1.0 μL
ddH ₂ O	up to 20.0 μL

表 1-8 连接反应体系
Table 1-8 Ligation reaction system

反应成分	体积
10 \times T4 DNA Buffer	2.0 μL
T4 DNA 连接酶	1.0 μL

反应成分	体积
pET30-Hsp70 载体	2.0 μ L
组合蛋白回收片段	6.0 μ L
ddH ₂ O	up to 20.0 μ L

2.2.4 DH5 α (T1) 感受态细胞的制作

(1) 将保存于-80℃的 T1 甘油菌在无抗 LB 固态培养基上进行三区划线，然后在 37℃细菌培养箱中放置培养大约 12 h。

(2) 当单菌落明显显现出时，挑单菌落放置于 100 mL 无抗性的 LB 培养基中，将培养基放置摇床上，37℃，100 rpm 摇菌约 6 h，测培养基 OD 值，OD 值在 0.5 左右时可以停止摇菌。

(3) 将菌液置于冰上进行冰浴，随后降温后分装至 50 mL 无菌离心管中，4℃，4000 g 离心 5 min。

(4) 弃去离心上清，加入离心管 10 mL 制作感受态细胞试剂 Buffer A，轻轻吹打，放置冰上冰浴后，4℃，4000 g 离心 5 min。

(5) 弃去离心上清，加入离心管 10 mL 制作感受态细胞试剂 Buffer B，轻轻吹打，置于冰上重悬后，分装至 1.5 mL EP 管中，保存在-70℃冰箱。

2.2.5 连接产物转化

将连接产物转化感受态细胞 DH5 α (T1)，具体步骤如下：

(1) 从-70℃冰箱中取出 DH5 α (T1)，放置冰上融化。

(2) 在超净台中，将单个产物加入 50 μ L DH5 α (T1) 并轻轻吹匀，放置冰上 25 min。

(3) 42℃金属浴热激 30 s，结束后置于冰上冰浴 2 min。

(4) 在产物中加入 1 mL 无抗性的液体 LB，放置 37℃的摇床中，220 rpm 培养 1 h。

(5) 培养完毕后取出指型管，吸出 70 μ L 培养产物均匀涂抹在卡纳抗性的固体 LB 上，待液体被吸收后倒置放于 37℃的培养箱中过夜培养，剩余的培养产物放置 4℃保存。

2.2.6 重组抗原载体菌液 PCR 鉴定

挑取平皿中单菌落，置于 2 mL 卡纳抗性 LB 培养基中摇菌 12 h。摇菌完成后进行菌液 PCR，具体反应体系见下表。

表 1-9 PCR 反应体系
Table 1-9 PCR reaction system

反应成分	体积
2×Tap Mix	7.5 μL
F	1.0 μL
R	1.0 μL
菌液	1.0 μL
ddH ₂ O	up to 15.0 μL

PCR 反应条件：95℃预变性 5 min，95℃变形 15 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 3 min，35 个循环，72℃最终延伸 5 min。

2.2.7 质粒的提取与鉴定

将培养了 12-16 h 的平板从培养箱中取出，挑取单菌落接种于 10 mL 卡那抗性的液体 LB 中，置于 37℃摇床中震荡培养 16 h，用全式金公司的质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒，具体步骤如下：

- (1) 取过夜培养的菌液 10 mL，8000 g 离心 5 min 弃上清。
- (2) 加入 500 μL 无色溶液 RB（含 RNase A）吹打均匀，不应有小的菌团。
- (3) 加入 500 μL 蓝色溶液 LB，温和地上下翻滚 5 次，使菌体裂解均匀，颜色由浑浊变清澈。
- (4) 加入 750 μL 黄色溶液 NB，温和地上下翻滚 5 次，混合均匀，颜色由蓝色变成黄色，直至形成黄色凝集块，静置 2 min。
- (5) 12000 g 离心 5 min，吸取上清至吸附柱中，静置 1 min 后 12000 g 离心 1 min 并弃滤液。
- (6) 加入 650 μL WB 溶液，12000 g 离心 1 min 并弃滤液。
- (7) 12000 g 空离 1 min 彻底清除 WB 溶液后弃滤液。
- (8) 开盖静置 5 min，散发乙醇。
- (9) 将离心柱置于干净的指型管中，加入 40 μL 的 EB 溶液静置 1 min 后

10000 g 离心 1 min 洗脱 DNA,洗脱出的 DNA 置于-20℃备用。

对提取的质粒进行 PCR 鉴定,用 pET-30a 载体上的通用 T7 引物进行 PCR,PCR 的体系和程序同 2.2.2.1,将 PCR 鉴定正确的质粒由上海生工公司进行测序鉴定。

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

2.3.1 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

为尝试诱导重组抗原表达,将 pET30a 的组合抗原质粒和 pET30a 空载质粒分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,转化步骤参照 2.2.5。均匀的涂布在含有卡那抗性固体 LB 培养基上,倒置于 37℃培养箱中过夜培养,待单菌落显现出时挑取单个菌落至 10 mL 卡那抗性的液体 LB 培养基中,摇菌 8 至 12 h 左右至菌液混浊。按照 1:50 的比例,取 10 mL 菌液接种至 500 mL 卡那抗性的液体 LB 培养基中,37℃、220 g 摇菌大约 2.5 h。此时测试待表达菌液析光度,OD_{600nm} 在 0.5-0.6 之间时,加入无菌 100 mM 浓度的 IPTG 2.5 mL,使待表达菌液 IPTG 终浓度为 0.5 mM。将待表达菌液放置摇床,常温诱导 37℃、220 g 大约 10 h,低温诱导 16℃、220 g 大约 10 h。诱导表达结束后,收集菌液放置离心管中 8000 g 离心 10 min,离心结束后弃上清,用 20 mL PBS 重悬沉淀洗涤菌体,将菌液加入离心管中 8000 g 离心 10 min,重复洗涤 2 次后加入 15 mL PBS 重悬菌体沉淀。洗涤完毕后进行超声破碎,超声程序为:超声 3 s,停 2 s,功率 70%,超声 30 min。超声结束后将超声产物加入离心管中 12000 g 离心 10 min,上清加入干净的 15 mL 离心管中分装,沉淀用 3 mL 的 8 M 尿素重悬后放置摇床 28℃、220 g 摇匀大约 30 min。结束将样品加入 15 mL 离心管 12000 g 离心 10 min,收集上清。分别取 60 μL 空载菌液、未诱导的菌液、诱导后的上清和沉淀,加入 20 μL 的 4×蛋白上样缓冲液,吹打均匀后放置 100℃金属浴中煮样 8 min,用于 SDS-PAGE 和 Westert blot 分析重组抗原表达情况。

2.3.2 pET30-Hsp70-组合蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳

凝胶配制的体系如下表:

表 2-7 SDS-PAGE 凝胶电泳的配制体系
Table 2-7 Preparation system of SDS-PAGE gel electrophoresis

成分	12%分离胶 (mL)	5%浓缩胶 (mL)
ddH ₂ O	2.8	2.74
30% Acrylamide	3.2	0.67
4×tracking buffer (pH 6.8)	0	0.5
4×separating buffer (pH 8.8)	2	0
10% APS	0.05	0.04
TEMED	0.015	0.004

(1) 验漏：取干净的垂直电泳玻璃板用夹板固定，在玻璃板之间加满超纯水等待 10 min，如果水位没下降，将玻璃板中倒掉并用吸水纸吸干玻璃板间残余的水。如果水位下降则重新用夹板固定玻璃板。

(2) 配制分离胶：按表中的配方配制分离胶溶液，混合均匀并加入垂直电泳玻璃板之间，加至离玻璃板顶部三分之一处，加入异丙醇至玻璃板顶处将分离胶压平，静置 30 min 等待分离胶凝固。

(3) 配制浓缩胶：待分离胶凝固后将上层的异丙醇弃去，并用吸水纸吸干残余液体。按照表中配方配制浓缩胶溶液，混合均匀后加入玻璃板至顶部，加完后需刻插上对应大小梳子，静置 30 min 等待浓缩胶凝固。

(4) 待浓缩胶凝固后拔掉梳子，将垂直电泳玻璃板拆下放入垂直电泳槽中，在相应孔中加入 4-7 μ L 样品，将 Running Buffer 加满电泳槽并加入冰袋，80 v 电压恒压 120 min。

(5) 考马斯亮蓝染色及脱色：电泳结束后将分离胶拆下放置于染色盒中，倒入考马斯亮蓝染色 4 h 以上，待染色结束后将考马斯亮蓝回收并倒入脱色液，待脱色完毕后用凝胶成像系统观察并留存图片。

2.3.3 重组蛋白的 Westert blot 分析

(1) 电泳结束后，取垂直玻璃板取下凝胶，泡入转印液中保持湿润。用尺量出凝胶大小，并裁出相应大小的 NC 膜，与滤纸和海绵置于转印液中浸泡。

(2) 取出转印夹并平放，在转印夹上负极（黑色）依次放上已经浸湿海绵、

滤纸、凝胶、NC 膜、滤纸、海绵，注意用滚轮将凝胶和 NC 膜之间压平，最后用正极（红色）压紧转印夹，插入转印槽中在冰上 250 mA、90 min。

（3）转印结束后，将 NC 膜放入提前遇冷的 5%脱脂乳中封闭 1h，封闭结束后用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。

（4）将 NC 膜放入提前稀释好的一抗中 4℃孵育 10 h 左右，孵育完毕后用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。

（5）将 NC 膜放入提前稀释好的二抗中常温孵育 1 h 左右，孵育完毕后用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。

（6）二抗孵育完毕完成洗涤后，避光显影。

2.3.4 重组蛋白的大量诱导表达及纯化

大量诱导后的菌体用超声破碎仪破碎，4℃，12000 g 离心收集上清，弃去沉淀。上清和所有纯化试剂用 0.45 μm 滤膜除菌，用金斯瑞公司 Ni-NTA 亲和层析介质纯化重组蛋白，具体步骤如下：

（1）吸取 5 mL Ni-NTA 亲和层析介质加入过滤柱中，待保护液流尽后加入过滤片压紧纯化介质，加入 15 mL 超纯水清洗柱子。

（2）超纯水流尽后，加入 10 mL LE Buffer 平衡柱子。

（3）向柱子中加入纯化蛋白，重复上样 3 次，控制流速让样品液缓慢流出，流出的样品冰上保存。

（4）在过滤柱中加入洗涤缓冲液，收集样品用蛋白浓度测试仪不断测试直至蛋白浓度降至 0.2 mg/mL 以下再停止洗涤。

（5）在过滤柱中加入洗脱缓冲液，收集样品直至浓度在 0.2 mg/mL 以下再停止收集。样品分装长期保存于 -70℃。

（6）加入 15 mL LE Buffer 至过滤柱中平衡柱子，最后加入 20%乙醇放置 4℃保存。

2.3.5 重组蛋白透析纯化

将透析袋放入 100℃沸水处理 10 min，在透析袋中加入收集的蛋白，用夹子密封住透析袋两端随后放入 1 L PBS 中，在 4℃环境下过夜透析，透析完成后用对应大小超滤管对蛋白进行浓缩，浓缩完毕后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，最后分装保存在 -70℃。

2.3.6 重组蛋白浓度测试

(1) 将稀释好的蛋白标准品按 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078 mg/mL 在酶标条样品孔加 20 μ L。

(2) A 液和 B 液分别按 50: 1 制备工作液，在每个样品孔中加 200 μ L，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中静置 20-30 min。

(3) 将酶标条放入酶标仪中用 OD₅₆₀ 检测，根据标准品的 OD 值建立标准曲线方程，将样品的 OD 值代入方程，计算出重组蛋白浓度。

3 结果

3.1 Hsp70c 基因的扩增结果

以实验室保存的 *Hsp70* 质粒为 DNA 模板，用特异性引物进行扩增，PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，结果显示，成功扩增出一条 799 bp 的条带（图 1-1），条带大小与预测相符，说明成功扩增片段。

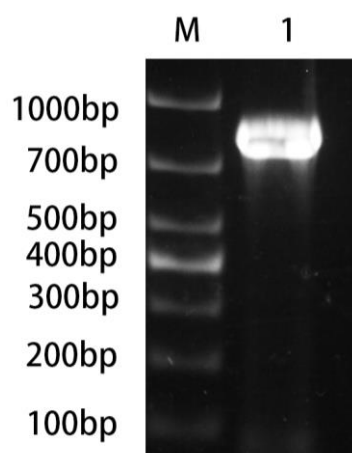


图 1-1 Hsp70c 目的片段 PCR 扩增结果

Figure 1-1 PCR amplification of Hsp70c target fragments

M: DL1000 marker; 1: Hsp70c target fragment

3.2 pET30a-Hsp70c 重组载体菌液 PCR 结果

为了检测 Hsp70c 与 pET30a 是否连接成功，通过载体上的 T7 引物对连接转化的产物进行 PCR 鉴定结果显示，PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，结果显示，成

功扩增出了 1167 bp 的条带（图 1-2），条带大小与预期结果相符，表明 pET30a-Hsp70c 构建成功。

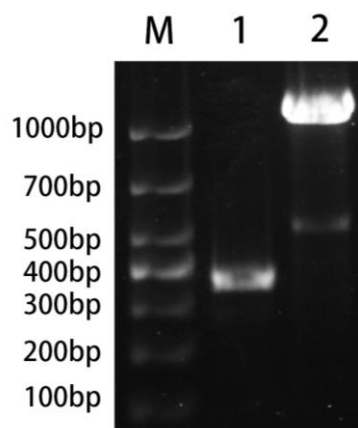


图 1-2 重组质粒的 PCR 鉴定

Figure 1-2 PCR identification of recombinant plasmid

M:DL1000 marker; 1: pET30a 空载; 2: pET30a-Hsp70c

3.3 重组抗原载体菌液 PCR 鉴定

为了检测 5 种重组抗原与 pET30a-Hsp70c 是否连接成功，通过载体上的 T7 引物对连接转化的产物进行 PCR 鉴定。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，结果显示，pET30a 空载（图 1-3A）显示为 368 bp；pET30a-M448R-I73R-Hsp70c 重组载体（图 1-3B）显示为 2471 bp；pET30a-p37-I177L-Hsp70c 重组载体（图 1-3C）显示为 2637 bp；pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c 重组载体（图 1-3D）显示为 2811 bp；pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c 重组载体（图 1-3E）显示为 2465 bp；pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜）重组载体（图 1-3F）显示为 2661 bp，条带大小与预期结果相符，表明重组载体初步构建成功。

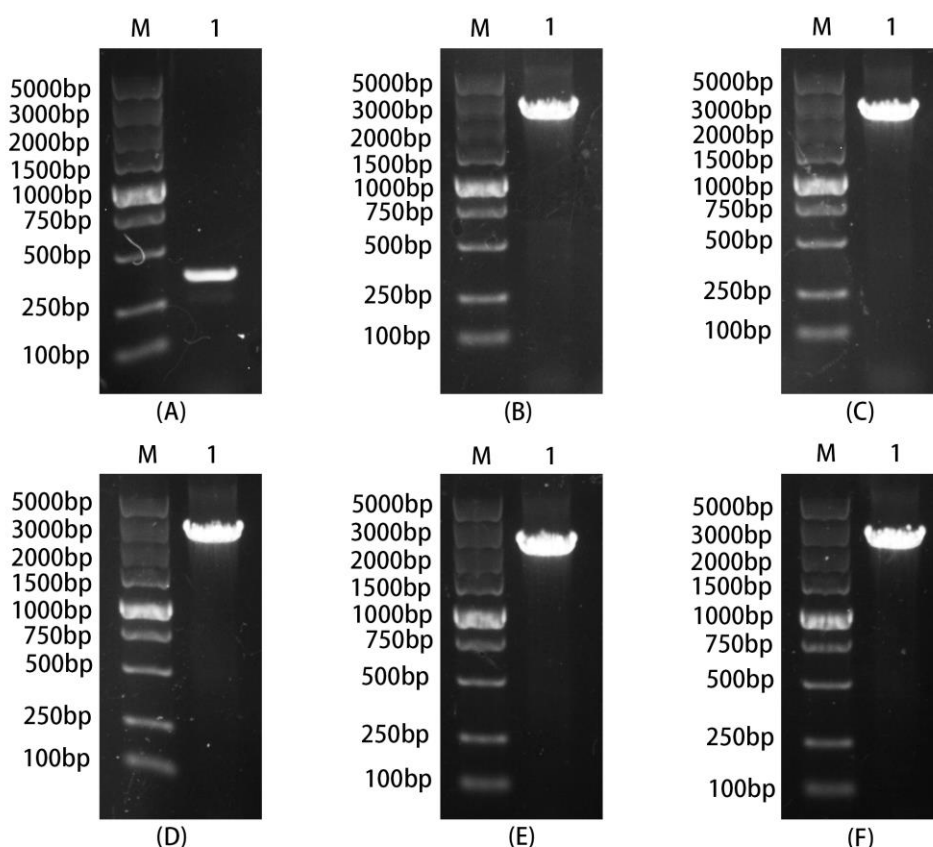


图 1-3 重组质粒的 PCR 鉴定

Figure 1-3 PCR identification of recombinant plasmid

(A)M: DL5000 (下同); 1: pET30a 空载; (B) 1: pET30a-M448R-I73R-Hsp70c;
 (C) 1: pET30a-p37-I177L-Hsp70c; (D) 1: pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c;
 (E) 1: pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c; (F) 1: pET30a-E199L-F317L-Hsp70c (去跨膜)

3.4 重组抗原载体酶切鉴定

为了继续鉴定重组载体是否构建成功, 经过 PCR 菌液鉴定后, 对重组载体进行质粒提取。选择 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点对重组质粒进行酶切验证。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, pET30a 空载 (图 1-4A) 显示单一条带, 为 5422 bp, pET30a-M448R-I73R-Hsp70c 重组载体 (图 1-4B) 目的条带显示为 2471 bp, pET30a-p37-I177L-Hsp70c 重组载体 (图 1-4C) 显示为 2637 bp, pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c 重组载体 (图 1-4D) 显示为 2811 bp, pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c 重组载体 (图 1-4E) 显示为 2465 bp, pET30a-E199L-F317L-

Hsp70c（去跨膜）重组载体（图 1-4F）显示为 2661 bp。用 Snapgene 软件分析，与所预测的条带完全一致。说明成功构建了重组质粒，随后经测序验证未发生碱基的突变，可进行下一步试验。

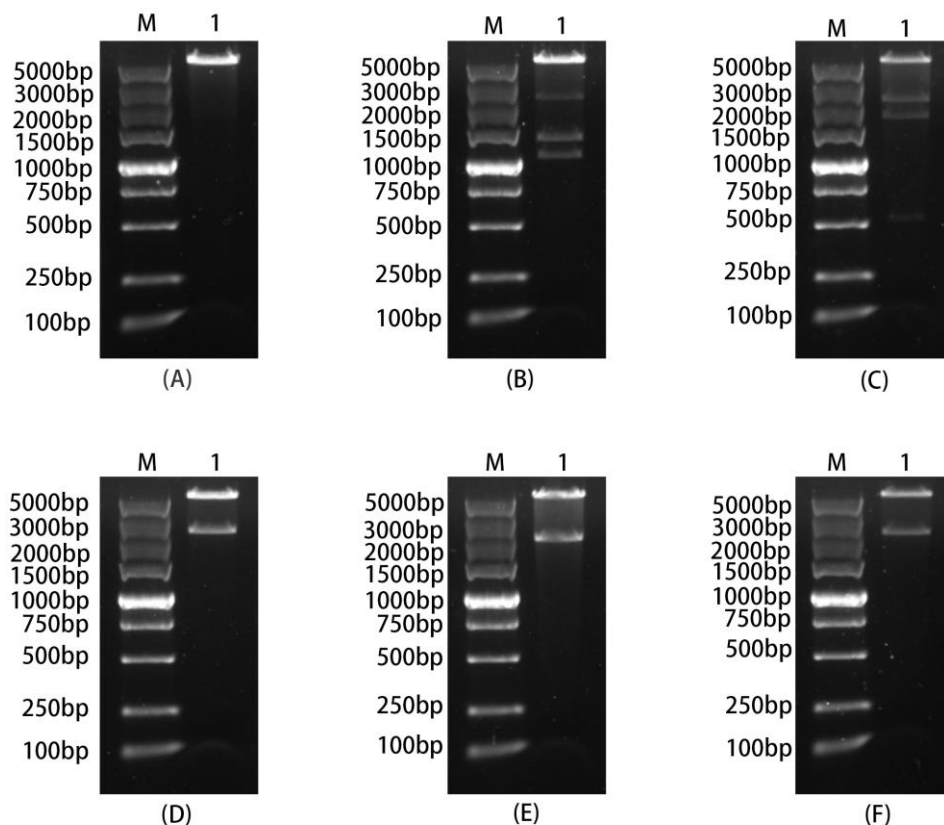


图 1-4 重组质粒 BamH I和 Hind III 酶切鉴定结果

Figure 1-4 Bam HI and Hind III restriction enzyme rection of recombinant plasmid

(A)M: DL5000（下同）；1: pET30a；（B）1: pET30a-M448R-I73R-Hsp70c；（C）1: pET30a-p37-I177L-Hsp70c；（D）1: pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c；（E）1: pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c；（F）1: pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜）

3.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定结果

为尝试诱导重组抗原表达，将重组质粒转入 BL21 感受态细胞中，经 IPTG 诱导及超声破碎后，分别收取全菌、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定。如图所示，5 种重组蛋白在添加 IPTG 与未添加 IPTG 情况下，IPTG 诱导的蛋白条带更加明显。在不同温度诱导条件下，低温条件下对比常温，IPTG 诱导的重组蛋白

更多，杂蛋白更少。在 2 种条件下，IPTG 诱导的重组蛋白均能在上清和沉淀中表达。经过 NI-NTA 柱纯化蛋白后，目的蛋白纯化效果较好。经过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，最终得到 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c 大小显示为 95.6 kDa，浓度为 1.26 mg/mL（图 1-5）；pET30a-p37-I177L-Hsp70c 大小显示为 90 kDa，浓度为 1.0 mg/mL（图 1-6）；pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c 大小显示为 97.8 kDa，浓度为 0.78 mg/mL（图 1-7）；pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c 大小显示为 84.2 kDa，浓度为 1.27 mg/mL（图 1-8）；pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜）大小显示为 91.26 kDa，浓度为 1.72 mg/mL（图 1-9），经过 Snapgene 软件分析，与预期蛋白大小相符。

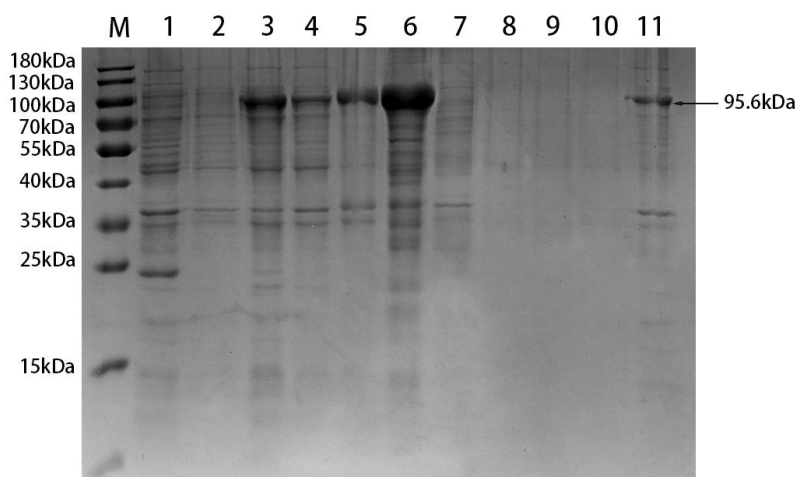


图 1-5 M448R-I73R-Hsp70c 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Figure 1-5 SDS-PAGE analysis of expression of M448R-I73R-Hsp70c recombinant proteins

M: Marker; 1: pET30a 空载菌液; 2:未诱导菌液; 3:常温诱导上清; 4:常温诱导沉淀; 5:低温诱导上清; 6:低温诱导沉淀; 7:样品流出液; 8-10:洗涤流出液; 11: 洗脱流出液

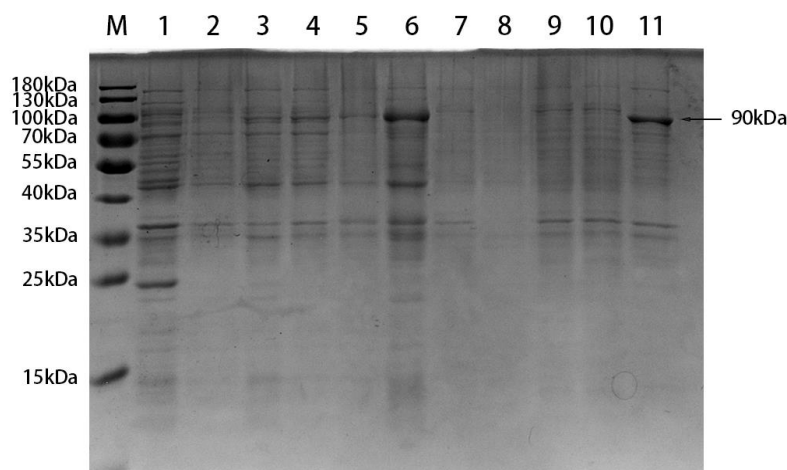


图 1-6 p37-I177L-Hsp70c 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Figure 1-6 SDS-PAGE analysis of expression of p37-I177L-Hsp70c recombinant proteins

M: Marker; 1: pET30a 空载菌液; 2:未诱导菌液; 3:常温诱导上清; 4:常温诱导沉淀; 5:低温诱导上清; 6:低温诱导沉淀; 7:样品流出液; 8-10:洗涤流出液; 11: 洗脱流出液

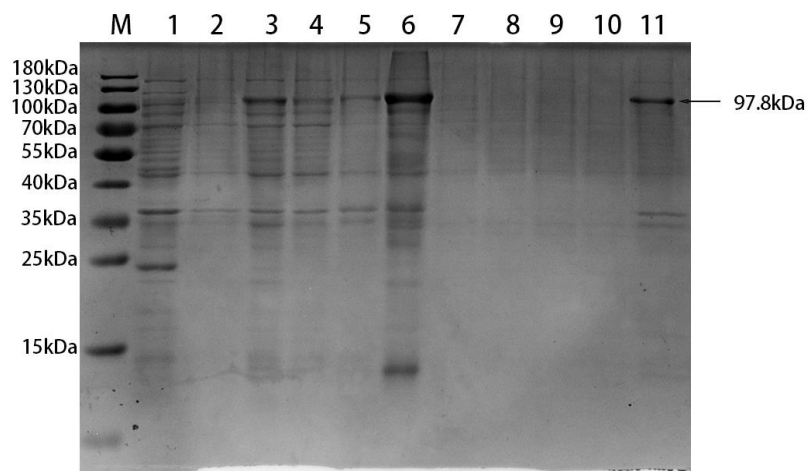


图 1-7 MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Figure1-7 SDS-PAGE analysis of expression of MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c recombinant proteins

M: Marker; 1: pET30a 空载菌液; 2:未诱导菌液; 3:常温诱导上清; 4:常温诱导沉淀; 5:低温诱导上清; 6:低温诱导沉淀; 7:样品流出液; 8-10:洗涤流出液; 11: 洗脱流出液

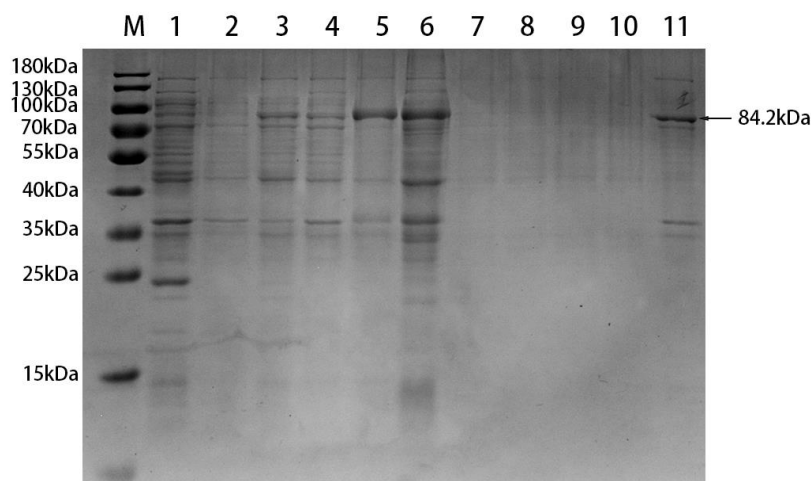


图 1-8 A151R-CP129R-E146L-Hsp70c 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Figure 1-8 SDS-PAGE analysis of expression of A151R-CP129R-E146L-Hsp70c recombinant proteins

M: Marker; 1: pET30a 空载菌液; 2:未诱导菌液; 3:常温诱导上清; 4:常温诱导沉淀; 5:低温诱导上清; 6:低温诱导沉淀; 7:样品流出液; 8-10:洗涤流出液; 11: 洗脱流出液

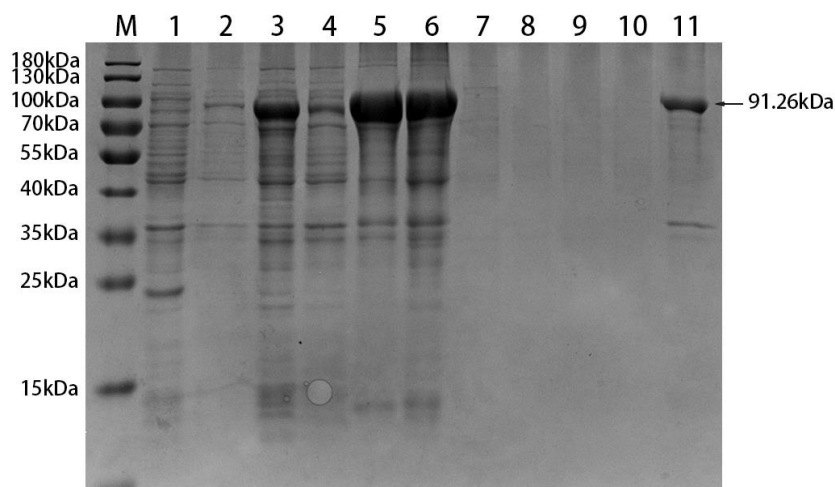


图 1-9 E199L-F317L-Hsp70c(去跨膜)重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Figure 1-9 SDS-PAGE analysis of expression of E199L-F317L-Hsp70c (Remove the transmembrane region) recombinant proteins

M: Marker; 1: pET30a 空载菌液; 2:未诱导菌液; 3:常温诱导上清; 4:常温诱导沉淀; 5:低温诱导上清; 6:低温诱导沉淀; 7:样品流出液; 8-10:洗涤流出液; 11: 洗脱流出液

3.6 重组蛋白的 Western blot 鉴定结果

为了验证重组蛋白是否正确，对纯化的重组蛋白进行 Western blot 鉴定，一

抗使用 ASFV 阳性血清，二抗使用辣根过氧化物酶（HRP）兔抗猪，检测重组蛋白是否正确。结果显示，pET30a-M448R-I73R-Hsp70c（图 1-10A）显示 95.6 kDa；pET30a-p37-I177L-Hsp70c（图 1-10B）显示为 90 kDa；pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c（图 1-10C）显示为 97.8 kDa；pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c（图 1-10D）显示为 84.2 kDa；pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜）（图 1-10E）显示为 91.26 kDa。表明目的蛋白可以和 ASFV 阳性血清产生特异性反应，重组蛋白表达正确。

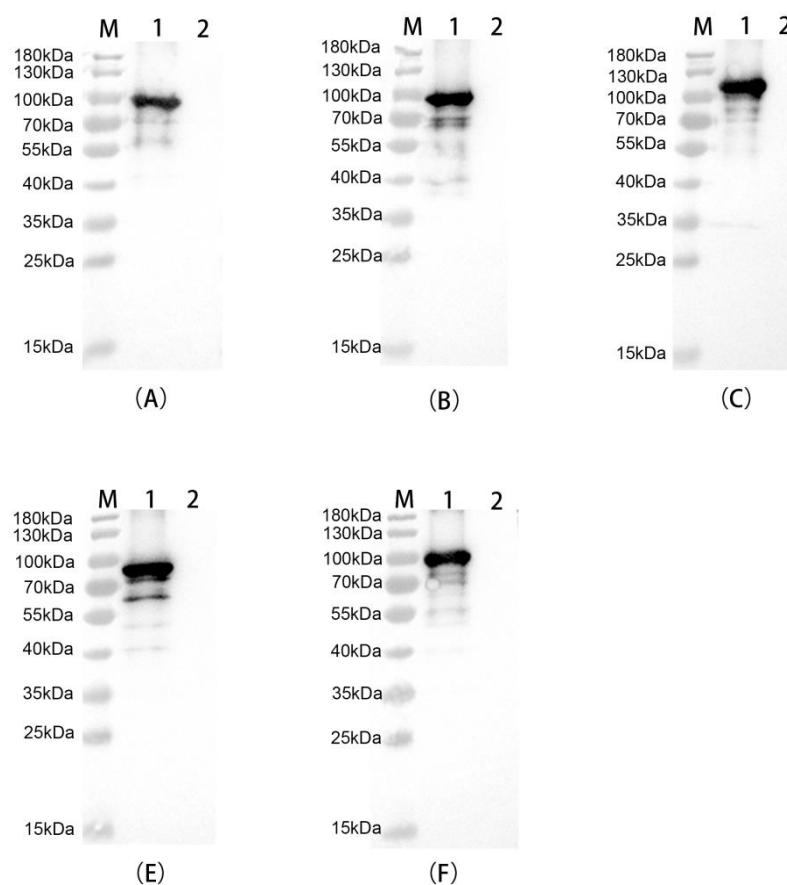


图 1-10 重组蛋白表达的 Western blot 结果

Figure 1-10 Western blot analysis of expression of recombinant proteins

注：（A）pET30a-M448R-I73R-Hsp70c（M：Marker；1：样品组（下同）；2：pET30a 空载；（B）pET30a-p37-I177L-Hsp70c；（C）pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c；（D）pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c；（E）pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜）

4 讨论

ASF 作为一种危害性极强的传染病, 给中国养猪业造成了巨大损失。由于 ASFV 本身的复杂性, 尚无有效的药物能够治疗 ASF, 因此扑杀感染动物是目前最有效的防控手段。疫苗免疫是目前防控传染病的主要方法, 最近研究发现, 亚单位疫苗对于防控 ASFV 具有良好前景。在原核表达系统中, 大肠杆菌和芽孢杆菌是常用的宿主菌, 其中大肠杆菌原核表达系统是最常用的外源表达系统^[13], 该系统具有增殖快、稳定性好且产生的蛋白具有良好的免疫原性和安全性^[14]。Zhang 等人用大肠杆菌载体, 选择 6 个 ASFV 抗原配合佐剂, 以鸡尾酒式混合免疫试验猪, 结果发现免疫猪血清能够检测到较高的体液和细胞免疫。在体外试验中, 免疫猪的血清和 PBMCs 分别中和 ASFV 82.8%和 92.6%的感染^[15]。因此, 利用大肠杆菌原核表达系统作为载体来研发 ASF 亚单位疫苗是一个值得研究的方向。

使用单一的 ASFV 抗原免疫, 对猪类产生的保护力有限, 为了显著提升免疫效果, 必须结合多种抗原进行组合免疫。研究发现, 使用多种抗原串联表达并配合佐剂可以诱导机体产生较好的免疫效果并且能减轻试验猪攻毒后的临床症状^[16]。ASF 保护性免疫需要体液和细胞免疫协同参与, 前期研究发现, Hsp70c 能显著增强机体产生体液和细胞免疫应答, 是一种极具潜力的分子佐剂。在 ASFV 众多抗原中, I177L、A151R、F317L 是 ASFV 毒力相关基因^[1-3]; E199L、I73R、p37 是维持 ASFV 完整性有重要作用, 和病毒感染性密切相关^[4-6]; M448R 与 C129R 与宿主免疫逃逸有关^[7, 8]; MGF110 4L-5L、I125L、E146L 参与机体细胞免疫^[9]。基于上述研究背景, 本试验构建了亚单位疫苗串联表达系统, 包括 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 亚单位疫苗串联表达系统, 用于后续 ASF 亚单位疫苗的制备。

在构建过程中, 为提高表达成功率, ASFV 抗原基因被优化成大肠杆菌核苷酸序列。5 种组合抗原基因与佐剂 Hsp70c 基因同时插入 pET-30a 载体中。但是在试验过程中发现, pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 并没有表达。多项研究证明跨膜蛋白在大肠杆菌中难以表达^[17, 18]。用跨膜预测器 TMHMM2.0 分析 E199L 基因发现其 148-170 位氨基酸为跨膜区域。因此推测, E199L 基因未表达是因为具有跨膜区域。因此, 本研究将 148-170 位氨基酸编码基因截去后, 将去跨膜区的

E199L 基因插入到 pET30a 中，最终该蛋白成功表达。

大肠杆菌在 37°C 环境中表达速度快，可能产生较多的包涵体，但是表达时间短，适合表达易降解的蛋白。16°C 的低温条件下表达速度慢一些，缓慢诱导使目的蛋白从包涵体形式转向可溶表达，使目的蛋白有充足的时间正确折叠，表达效果可能更好。通过 IPTG 在 37°C 环境中诱导表达，SDS-PAGE 分析可以均在上清和沉淀中表达，但是杂蛋白较多，给下一步纯化实验带来难度。通过 IPTG 在 16°C 环境中诱导表达，SDS-PAGE 分析发现目的蛋白在上清中表达且杂蛋白较少。因为表达在上清的蛋白能够实现正确折叠^[19]，并且蛋白纯化过程比较简单，因此蛋白表达实验选择用 IPTG 在 16°C 环境中诱导蛋白。

本研究表达的重组蛋白要用于疫苗研究，所以要得到纯度较高的蛋白。目前用于纯化的标签有 His、MBP、GST 等。但是常用的为 His 和 GST 标签，由于 His 标签长度较短（0.84 kDa），且不影响目的蛋白的其他功能，咪唑梯度洗脱蛋白较温和，保留了融合蛋白的免疫原性^[20]。即将 His 作为融合蛋白纯化标签，为纯化实验提供便捷。

参考文献

- [1] MV Borca, E Ramirez-Medina, E Silva, et al. Development of a highly effective african swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain [J]. J Virol, 2020, 94(7).
- [2] D Keita, L Heath, E Albina. Control of African swine fever virus replication by small interfering RNA targeting the A151R and VP72 genes [J]. Antivir Ther, 2010, 15(5): 727-36.
- [3] JK Jancovich, D Chapman, DT Hansen, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank african swine fever virus immunogenic and protective proteins [J]. J Virol, 2018, 92(8).
- [4] T Matamoros, A Alejo, JM Rodriguez, et al. African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration [J]. mBio, 2020, 11(4).
- [5] Y Liu, Z Shen, Z Xie, et al. African swine fever virus I73R is a critical virulence-related gene: a potential target for attenuation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(15): e2210808120.
- [6] A Eulalio, I Nunes-Correia, J Salas, et al. African swine fever virus p37 structural protein is localized in nuclear foci containing the viral DNA at early post-infection times [J]. Virus Res, 2007, 130(1-2): 18-27.
- [7] M Amitsur, R Levitz, G Kaufmann. Bacteriophage t4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA [J]. EMBO J, 1987, 6(8): 2499-503.
- [8] N Dodantenna, L Ranathunga, WaG Chathuranga, et al. African swine fever virus EP364R and C129R target cyclic GMP-AMP to inhibit the cGAS-STING signaling pathway [J]. J Virol, 2022, 96(15): e0102222.
- [9] CL Netherton, LC Goatley, AL Reis, et al. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1318.
- [10] Q Huang, JF Richmond, K Suzue, et al. In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent [J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 403-8.

- [11] L Yong, Z Huiyong, H Jing, et al. Vaccination with a potent DNA vaccine targeting B-cell epitopes of hGRP induces prophylactic and therapeutic antitumor activity in vivo [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(4): 459-68.
- [12] Y Bulut, KS Michelsen, L Hayrapetian, et al. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 20961-7.
- [13] O Gileadi. Recombinant Protein Expression in E. coli : A historical perspective [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1586: 3-10.
- [14] N Sheibani. Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 1999, 29(1): 77-90.
- [15] G Zhang, W Liu, S Yang, et al. Evaluation of humoral and cellular immune responses induced by a cocktail of recombinant african swine fever virus antigens fused with opri in domestic pigs [J]. *Virology*, 2023, 20(1): 104.
- [16] JM Argilaguet, E Perez-Martin, S Lopez, et al. Bacmam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with african swine fever virus [J]. *Antiviral Res*, 2013, 98(1): 61-5.
- [17] J Kaur, A Kumar, J Kaur. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 803-22.
- [18] F Baneyx. Recombinant protein expression in Escherichia coli [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 411-21.
- [19] PT Wingfield, I Palmer, SM Liang. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from escherichia coli [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2014, 78: 6 5 1-6 5 30.
- [20] ME Kimple, AL Brill, RL Pasker. Overview of affinity tags for protein purification [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, 73: 9 1-9 23.

第二章 ASFV 重组蛋白在昆虫细胞中的表达与纯化

杆状病毒表达系统（Baculovirus expression vector system, BEVS）是真核表达重组蛋白系统，基因组为单一闭合环状双链 DNA 分子，大小为 80~160 kb，其基因组可在昆虫细胞核内复制和转录。在 BEVS 中，DNA 复制后会被组装进杆状病毒的核衣壳内。核衣壳具有出色的柔韧性，能够容纳较大片段的外源 DNA 插入（通常高达 100 kDa）^[1]。

相比其他表达系统，BEVS 具有诸多显著优势。首先，它表达的蛋白具有极高的安全性，因为杆状病毒只感染特定的昆虫细胞，对人类和动物细胞无感染性。其次，BEVS 操作简便，可以在昆虫细胞内实现高效、稳定的基因表达。此外，由于是真核表达系统，BEVS 能够确保表达的蛋白具有良好的抗原性和生物活性。BEVS 与哺乳动物表达系统都属于真核表达系统，都具有较好的转录和翻译后修饰的机制。杆状病毒感染细胞需要的 MOI 值较低，最终感染 sf9 细胞的蛋白表达量要高于 HEK293T 细胞^[2]，并且重组蛋白可以产生更好的免疫效果^[3]。因此，BEVS 在多个方面优于哺乳动物表达系统^[4]。

近年来，基于 BEVS 的新型 Bac-to-Bac 系统在多个方面实现了显著的技术革新。例如，杆状病毒基因改造过程完全在大肠杆菌中完成，大大缩短传统技术的病毒纯化速度。并且，得到的重组杆粒可以直接感染昆虫细胞表达目的蛋白，提高了试验效率。此外，由于表达产物中带有 His 标签，最终用 NI-NTA 亲和层析介质可以得到高纯度的目的蛋白。

研究发现，ASFV 抗原，包括 *M448R*、*E199L*、*E146L*、*I177L*、*MGF110-4L*，均显示保护性作用，为 ASF 疫苗的研究提供了良好的前景。本研究通过分析 ASFV（JS）毒株基因序列，扩增出以上 5 种 ASFV 抗原。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统，构建了 5 个重组杆状病毒载体，rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L，通过 sf9 细胞表达重组蛋白，为后续实验提供生物材料。

1 材料

1.1 质粒、细胞系、菌株

pFast-Bac-HTA 载体、sf9 细胞、*E. coli* DH5 α (T1) 和 DH10Bac 感受态细胞

均由本实验室保存, ASFV (JS) DNA 来自扬州大学 ASF 研究所。

1.2 主要试剂

表 2-1 主要试剂和试剂盒
Table 2-1 The main reagents and kits

主要试剂和试剂盒	公司
细胞培养瓶	CORNING 公司
sf900 III 培养基	GIBCO 公司
病毒 DNA 提取试剂盒	苏州优逸兰迪生物科技有限公司
LipoInsect 转染试剂	上海碧云天生物技术有限公司
闪电克隆试剂盒	北京博奥龙生物科技有限公司
His 单抗	华安生物有限公司

1.3 试剂配制

三抗 LB 培养基: 称取 10.0 g Tryptone、5.0 g Yeast Extract、10.0 g NaCl, 溶解于超纯水中, 定容至 1 L, 121°C 高压灭菌冷却后, 按比例加入庆大霉素: 7 µg/mL; 四环素: 10 µg/mL; 卡纳霉素: 50 µg/mL。

蓝白斑筛选固体培养基: 称取 10.0 g Tryptone、5.0 g Yeast Extract、10.0 g NaCl、15.0 g 纯化琼脂粉, 溶解于超纯水中, 充分溶解后定容至 1 L。121°C 高压灭菌后, 固体培养基冷却至 45°C 左右时, 加入对应浓度的试剂: 庆大霉素: 7 µg/mL; 四环素: 10 µg/mL; 卡纳霉素: 50 µg/mL; IPTG: 40 µg/mL; X-gal: 40 µg/mL, 摇晃混匀后立即倒入灭菌的平皿中, 待凝固后 4°C 避光保存。

2 方法

2.1 引物设计

使用 Primer premier 5.0 软件设计引物, 分别从 ASFV DNA 扩增特异性目的片段, 并在片段前加上 gp64 信号肽。本章节研究所用引物如图所示。

表 2-2 引物序列

Table 2-2 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'-3')
M13F	TATTCCGGATTATTCATACC
M13R	ACAAATGTGGTATGGCTGA
E146L (1)	TTTTCAGGGCGCCAT <u>GGATCCC</u> ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACC AAG
E146L (2)	GCCCATGGTGGCCGCAAAGGCAGAATGCGC
E146L (3)	ATTCTGCCTTTGCGGCCACCATGGGCGGCACTACAGACTTT
E146L (4)	CTAGTACTTCTCGACA <u>AAGCTT</u> CTAGTGATGGTGATGGTGATGAATAAT ACGCTGTAGTCCGGTCA
M448R (2)	AGGACTCATTGCTCATGGTGGCCGCAAAGGCAGA
M448R (3)	CACCATGAGCAATGAGTCCTTCCCTG
M448R (4)	CTAGTACTTCTCGACA <u>AAGCTT</u> GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAGTGA GAGATGATGGACAGGTAGA
E199L (2)	ACTGGCATGCAAGACATGGTGGCCGCAAAGGCAGA
E199L (3)	ACCATGTCTTGCATGCCAGTTTCCA
E199L (4)	CTAGTACTTCTCGACA <u>AAGCTT</u> GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAAATTGT TTAGGTTTGAAAAAATAAGAG
I177L (2)	TAAC TTTCCACATGGTGGCCGCAAAGGCAGA
I177L (3)	GGCCACCATGTGGAAAGTTAATGATCAGGGC
I177L (4)	CTAGTACTTCTCGACA <u>AAGCTT</u> GTGGTGGTGGTGGTGGTGAAAGTAG ATGAACCTCTTTTGTTTTTTTATT
MGF110-4L (2)	CTACCAACATGGTGGCCGCAAAGGCAGAATGCGC
MGF110-4L (3)	TGCCTTTGCGGCCACCATGTTGGTAGTCTTCTTGGAATTC
MGF110-4L (4)	CTAGTACTTCTCGACA <u>AAGCTT</u> TCAGTGATGGTGATGGTGATGCAGAT CTTCTTTTCATAAATTTTCA

2.2 重组质粒的构建和鉴定

2.2.1 ASFV 抗原与信号肽的扩增

以实验室保存的 ASFV DNA 为模板，用上述合成的特异性引物扩增 ASFV 抗原与信号肽，PCR 扩增体系如下：

表 2-3 PCR 反应体系
Table 2-3 PCR reaction system

反应成分	体积
2×Taq Mix	7.5 μL
F	1.0 μL
R	1.0 μL
ASFV DNA	1.0 μL
ddH ₂ O	4.5 μL

PCR 反应程序如下：95℃预变性 5 min；95℃变性 15 s、60℃退火 15 s、72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃最终延伸 10 min。

2.2.2 载体双酶切

酶切鉴定方法参照第一章 2.2.2。

2.2.3 同源重组连接

将 PCR 扩增片段与载体用同源重组方法进行连接，具体反应体系见表，反应条件为 50℃水浴锅 20 min。

表 2-4 同源重组反应体系
Table 2-4 PCR reaction system

反应成分	体积
Lightening Cloning Kit	5.0 μL
gp64 信号肽	1.0 μL
片段	1.0 μL
载体	2.0 μL
ddH ₂ O	1.0 μL

2.2.4 重组载体菌液 PCR 鉴定

菌液 PCR 方法参照第一章 2.2.6。

2.2.5 重组载体酶切鉴定

酶切鉴定方法参照第一章 2.2.2。

2.3 重组杆粒的构建和鉴定

2.3.1 重组载体转座

(1) 将 DH10Bac 从 -80°C 拿出置于冰上融化，加入 1 μ L pFastBac HTA 重组质粒，轻轻混匀，置于冰上孵育 25 min 左右。

(2) 将孵育产物放置于 42°C 金属浴热激 30 s，结束后置于冰上冰浴 2 min。

(3) 在产物中加入 1 mL 无抗 LB 培养基，放置 37°C 的摇床中，220 g 培养 5 h。

(4) 摇菌完成后，吸取 70 μ L 培养产物均匀涂抹在蓝白斑筛选的固体 LB 培养基上。

(5) 随后将平皿倒置于 37°C 的培养箱中避光培养 48 h 左右。

2.3.2 菌液鉴定及杆粒 Bacmid 提取

重组载体经过转座后，经过蓝白斑筛选并 PCR 鉴定，用碧云天公司的杆状病毒质粒提取试剂盒提取杆状病毒质粒。具体步骤如下：

(1) 48 h 后挑取蓝白斑筛选培养基中的白斑，在三抗液体 LB 中摇菌 12 h 后进行菌液 PCR 鉴定，根据琼脂糖凝胶电泳条带大小判断是否为阳性菌液。

(2) 取 4 mL 菌液，10000 g 离心 1 min，弃上清。

(3) 加入 300 μ L 溶液 I（已添加 RNase A），重悬菌液，保证无团块菌落。

(4) 加入 300 μ L 溶液 II，轻轻上下颠倒离心管，使菌液彻底裂解完成，溶液透明。

(5) 加入 300 μ L 溶液 III，轻轻上下颠倒离心管，白色絮状物质产生，12000 g 离心 10 min。

(6) 吸取上清至新的离心管中，加入 800 μ L 预冷异丙醇，颠倒混匀，置于

冰上 10 min，冰浴完成后 12000 g 离心 10 min，弃上清。

(7) 底部沉淀用 500 μ L 预冷 70%乙醇重悬，15000 g 离心 5 分钟，弃上清。

(8) 沉淀再次用 200 μ L 预冷的 70%乙醇重悬，12000 g 离心 5 分钟后，弃上清。

(9) 等待乙醇挥发干净后，加入 20 μ L TE 溶解底部沉淀，测浓度后置于-20℃备用。

2.3.3 重组杆状病毒的拯救

(1) 将冻存的 sf9 细胞置于 37℃水浴锅中融化，吸取 5 mL sf900 III 培养基重悬冻存细胞，1000 g 离心 10 min。

(2) 弃上清，吸取 5 mL sf900 III 培养基重悬细胞沉淀，迅速转移至 T25 细胞瓶中，放置于 27℃细胞培养箱。当细胞密度达到 90%时，进行传代。

(3) 重组杆粒转染 sf9 细胞，计数 2×10^6 sf9 细胞于 2 mL sf900 III 培养基中铺在六孔板的一个孔中，放置于 27℃培养箱中使细胞完全贴壁，即可进行转染实验。

(4) 准备 2 个 1.5 mL ep 管，每管加入 100 μ L sf900 III 培养基，分别加入 8 μ L LipoInsect 转染试剂和 16 μ g 杆粒，轻轻吹打混匀，静置 5 min。

(5) 将稀释的杆粒加入稀释的 LipoInsect 转染试剂中，轻轻吹打混匀，静置 20 min。

(6) 将孵育产物加入细胞板中，4 h 弃掉培养基，换位新鲜培养基等待 96 h 后，收取上清，为 P1 代病毒。

(7) 将 sf9 细胞传代，六孔板按每孔接种 2×10^6 细胞数，待细胞贴壁后，按 MOI 为 0.1 进行病毒传代，待细胞病变严重，大量细胞悬浮，收取病毒液，按此种方法传代 2 次，收取第 3 代毒。

2.3.4 间接免疫荧光实验 (IFA)

(1) 在 6 孔板中铺入 sf9 细胞，每孔 3×10^6 细胞数的培养基 2 mL。设置阳性孔、阴性孔。

(2) 72 h 后，吸去细胞培养基上清，用 PBST 轻轻涮洗细胞表面 2 次，不可用力吸吹，防止细胞掉落。

(3) 每孔加入甲醛固定液覆盖，放入 4℃，30 min。后弃去固定液，用 PBST

反复清洗 3 次。

(4) 用 5%脱脂乳 PBST 覆盖细胞表面, 37°C ,封闭 1 h, 后弃去封闭液用 PBST 反复清洗 3 次。

(5) 加入 His 单抗覆盖细胞层, 37°C, 孵育 1 h。孵育完毕后弃去单抗液, 用 PBST 反复清洗 3 次。

(6) 加入荧光二抗, 覆盖细胞层, 37°C, 孵育 1 h。孵育完毕后弃去二抗, 用 PBST 反复清洗 3 次后避光显影。

2.3.5 重组蛋白的 Western blot 检测

按病毒液 MOI 值为 1 接种 sf9 细胞, 当 sf9 细胞病变严重, 用 PBS 将细胞轻轻吹下来, 1000 g 离心 10 min, 弃上清, 加入 PBS 清洗细胞, 去除细胞培养基成分。弃去上清后, 加入昆虫细胞裂解液, 重悬细胞。裂解完成后对细胞悬液超声破碎使细胞彻底裂解, 让表达蛋白溶解于 PBS 中, 超声裂解完成后 10000 g 离心 10 min, 收集上清和沉淀, 加入蛋白上样缓冲液制样。

2.4 重组蛋白的纯化

蛋白纯化方法参照第一章 2.3.4。

3 结果

3.1 ASFV 抗原与信号肽的扩增

以实验室保存的 ASFV DNA 和 gp64 基因为模板, 利用特异性引物成功扩增出 ASFV E199L、M448R、E146L、I177L 和对应的信号肽序列, 电泳结果显示: ASFV E199L 扩增片段 (图 2-1A) 大小为 597 bp; ASFV M448R 扩增片段 (图 2-1B) 大小为 1344 bp; ASFV E146L 扩增片段 (图 2-1C) 大小为 459 bp; ASFV I177L 扩增片段 (图 2-1D) 大小为 198 bp; ASFV MGF110-4L 扩增片段 (图 2-1E) 大小为 393 bp, gp64 信号肽基因扩增大小为 114 bp。条带大小与预期结果相符, 说明成功扩增目的条带。

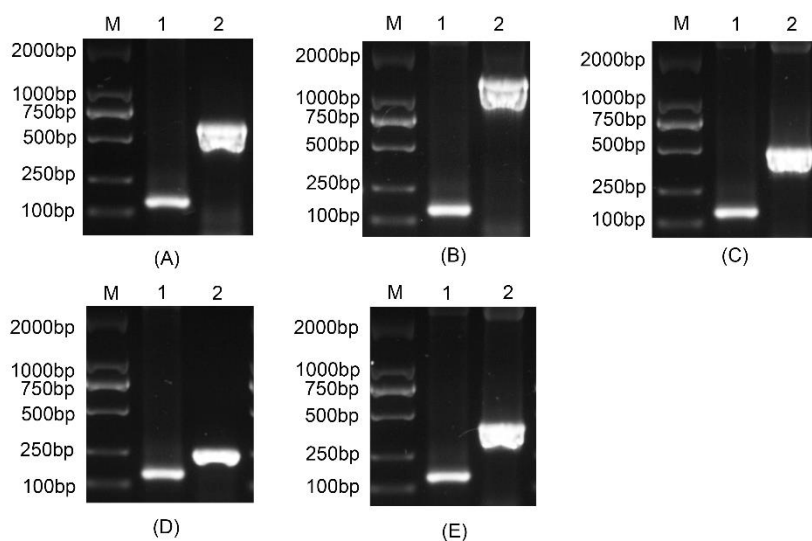


图 2-1 目的片段 PCR 扩增结果

Figure 2-1 PCR amplification target fragments

注：(A) ASFV E199L 扩增结果 (M:DL2000 DNA Marker; 1: gp64 信号肽; 2: 目的片段); (B) M448R 扩增结果; (C) E146L 扩增结果; (D) I177L 扩增结果; (E)

MGF110-4L 扩增结果

3.2 重组载体菌液 PCR 鉴定

为了检测重组抗原与 pfastbac HT A 载体是否连接成功, 通过载体上的 M13 鉴定引物对连接转化的产物进行 PCR 鉴定。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, pFastbac HT A 空载 (图 2-2A) 条带在 250 bp; pFastbac HT A-gp64- E199L 扩增产物 (图 2-2B) 条带在 840 bp; pFastbac HT A-gp64-M448R 扩增产物 (图 2-2C) 条带在 1587 bp; pFastbac HT A-gp64-E146L 扩增产物 (图 2-2D) 条带在 663 bp; pFastbac HT A-gp64- I177L 扩增产物 (图 2-2E) 条带在 441 bp; pFastbac HT A-gp64-MGF110-4L 扩增产物 (图 2-2F) 条带在 597 bp。条带大小与预期相符, 表明重组转移载体初步构建成功。

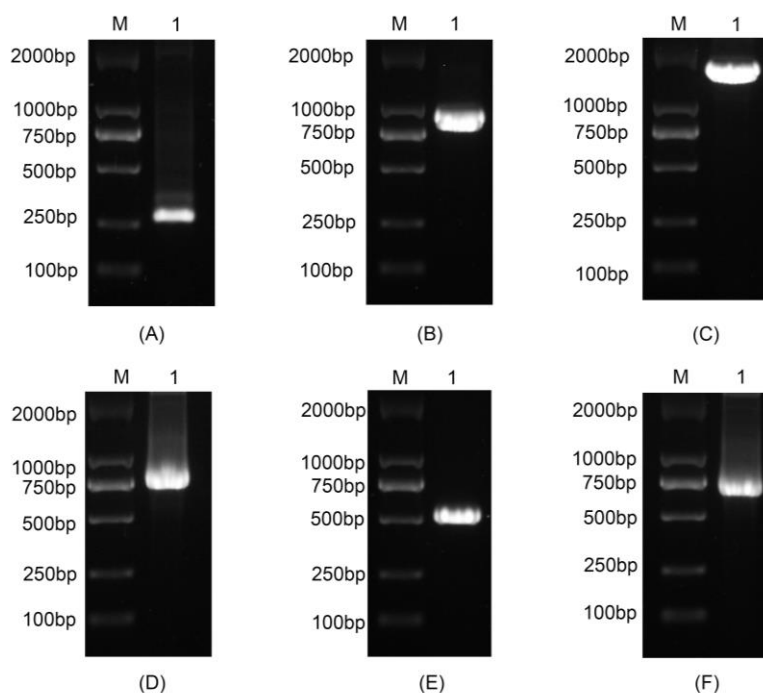


图 2-2 重组质粒的 PCR 鉴定

Figure 2-2 PCR identification of recombinant plasmid

注：(A) pFastbac HT A 空载扩增结果 (M: DL2000 DNA Marker; 1: 目的片段);
 (B) pFastbac HT A-gp64-E199L 扩增结果; (C) pFastbac HT A-gp64-M448R 扩增结果;
 (D) pFastbac HT A-gp64-E146L 扩增结果; (E) pFastbac HT A-gp64-I177L 扩增结果;
 (F) pFastbac HT A-gp64-MGF110-4L 扩增结果

3.3 重组载体的酶切鉴定

经过 PCR 菌液鉴定后, 对重组载体进行质粒提取, 为了继续鉴定重组载体是否构建成功, 选择 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点对重组质粒进行酶切验证。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, pFastbac HT A (图 2-3A) 只显示载体条带, 为 5000 bp; pFastbac HT A-gp64-E199L (图 2-3B) 显示为 742 bp; pFastbac HT A-gp64-M448R (图 2-3C) 显示为 1489 bp; pFastbac HT A-gp64-E146L (图 2-3D) 显示为 586 bp; pFastbac HT A-gp64-I177L (图 2-3E) 为 222 bp; pFastbac HT A-gp64-MGF110-4L (图 2-3F) 为 520 bp。用 Snapgene 软件分析, 与所预测的条带完全一致。说明成功构建了重组质粒, 随后经测序验证未发生碱基的突变, 可进行下一步实验。

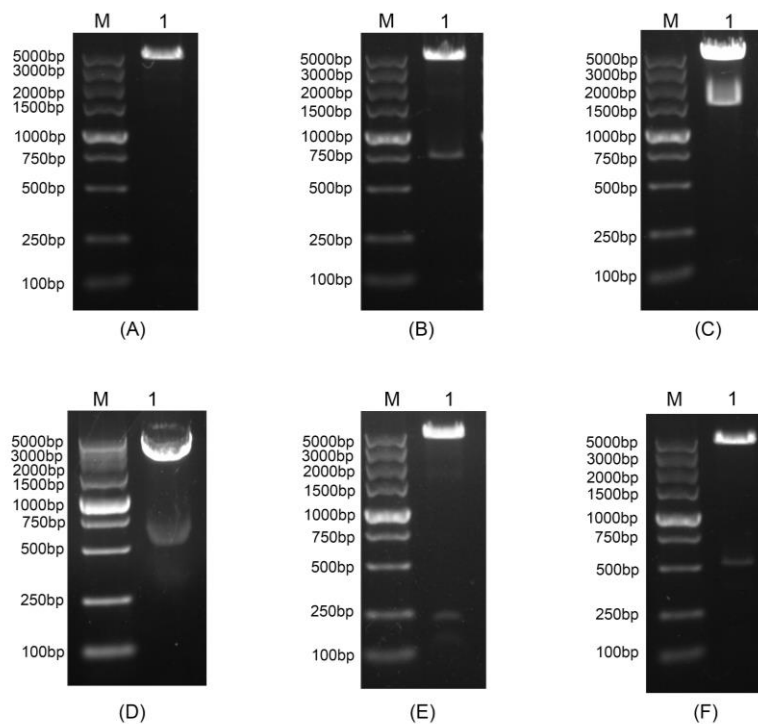


图 2-3 重组质粒 Bam HI和 Hind III 酶切鉴定结果

Figure 2-3 Bam HI and Hind III restriction enzyme rection of recombinant plasmid

注：（A）pFastbac HT A 载体酶切结果（M:DL5000 DNA Marker;1: 目的条带）；（B）pFastbac HT A-gp64-E199L 酶切结果；（C）pFastbac HT A-gp64-M448R 酶切结果；（D）pFastbac HT A-gp64- E146L 酶切结果；（E）pFastbac HT A-gp64- I177L 酶切结果；（F）pFastbac HT A-gp64-MGF110-4L 酶切结果

3.4 杆状病毒载体菌液 PCR 鉴定

将测序正确的重组转移载体分别转座至 DH10Bac 感受态,通过蓝白斑筛选,运用 M13 特异性引物对白色单菌落进行菌液 PCR,电泳结果显示:无转座成功的 PCR 产物(图 2-4A)条带大小为 2500 bp; rBacmid-gp64-E199L (图 2-4B)为 3340 bp; rBacmid-gp64-M448R (图 2-4C)为 4087 bp; rBacmid-gp64-E146L (图 2-4D)为 3163 bp; rBacmid-gp64-I177L (图 2-4E)为 2941 bp; rBacmid-gp64-MGF110-4L (图 2-4F)为 3097 bp,大小与预期相符,说明重组杆状病毒构建成功。

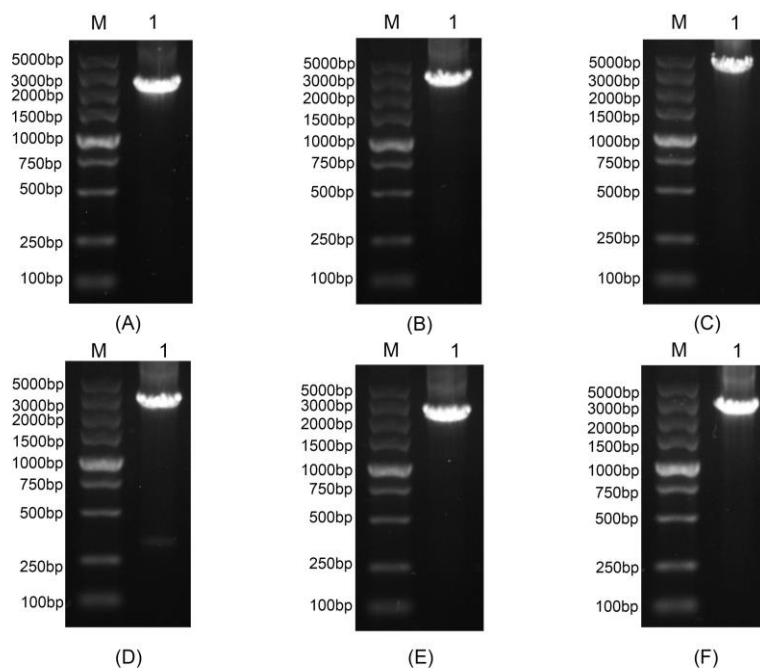


图 2-4 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Figure 2-4 PCR identification of recombinant baculovirus

注：(A) 阴性对照 (M: DL5000 DNA Marker; 1: 目的条带); (B) rBacmid-gp64-E199L 扩增结果; (C) rBacmid-gp64-M448R 扩增结果; (D) rBacmid-gp64-E146L 扩增结果; (E) rBacmid-gp64-I177L 扩增结果; (F) rBacmid-gp64-MGF110-4L 扩增结果

3.5 重组杆状病毒的拯救及其 IFA 鉴定

将重组杆状病毒质粒转染 sf9 细胞, 培养 96 h 后, 可观察到明显细胞病变后进行 IFA 鉴定, 结果如图所示 (图 2-5), 转染重组杆状病毒 rBacmid-gp64-M448R (图 2-5B)、rBacmid-gp64-E199L (图 2-5C)、rBacmid-gp64-E146L (图 2-5D)、rBacmid-gp64-I177L (图 2-5E)、rBacmid-gp64-MGF110-4L (图 2-5F) 的细胞可以观察到特异的绿色荧光, 而且阴性对照组 (图 2-5A) 未检测到荧光, 表示重组杆状病毒成功拯救。

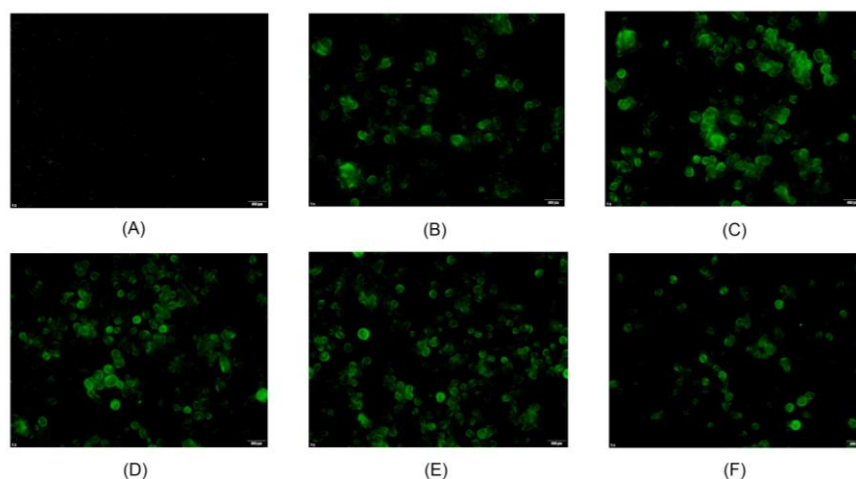


图 2-5 重组杆状病毒质粒转染 Sf9 细胞 IFA 鉴定图 (标尺=500 μm)

Figure 2-5 Sf9 cells were transfected with recombinant baculovirus plasmid by IFA (Scale bar=500 μm)

注: (A) 阴性对照; (B) rBacmid-gp64-M448R 荧光结果; (C) rBacmid-gp64-E199L 荧光结果; (D) rBacmid-gp64-E146L 荧光结果; (E) rBacmid-gp64-I177L 荧光结果; (E) rBacmid-gp64-MGF110-4L 荧光结果

3.6 重组蛋白的 Western blot 检测

为了验证杆状病毒系统表达的重组蛋白是否正确, 对重组蛋白进行 Western blot 鉴定, 一抗使用 6 \times His 标签抗体, 二抗使用 HRP 标记兔抗鼠, 检测蛋白是否表达, 结果显示 rBacmid-gp64-E146L (图 2-6A) 在 24.6 kDa; rBacmid-gp64-E199L (图 2-6B) 在 31.3 kDa; rBacmid-gp64-M448R (图 2-6C) 在 61.3 kDa; rBacmid-gp64-I177L (图 2-6D) 在 17 kDa; rBacmid-gp64-MGF110-4L (图 2-6E) 在 22.7kDa, 大小与预期相符, 说明重组蛋白表达成功。

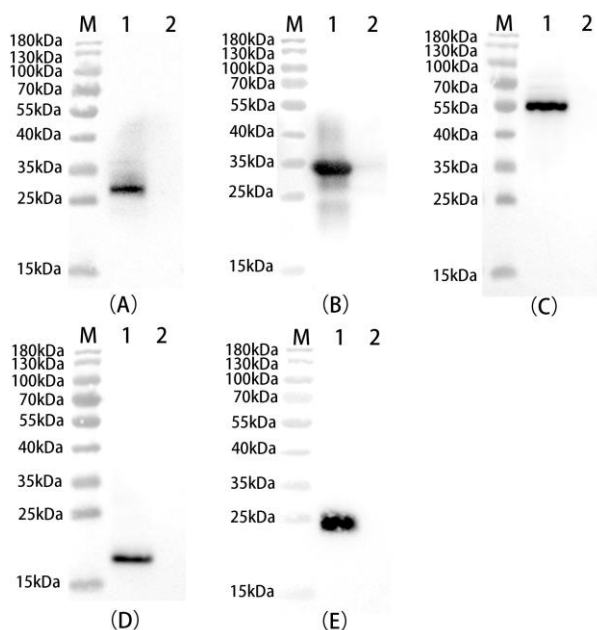


图 2-6 重组蛋白表达的 Western blot 鉴定图

Figure 2-6 Western blot analysis of expression of recombinant proteins

注：(A) rBacmid-gp64-E146L (M: Marker; 1: 样品组; 2: 空白对照 (下同)); (B) rBacmid-gp64-E199L; (C) rBacmid-gp64-M448R; (D) rBacmid-gp64-I177L; (E) rBacmid-gp64-MGF110-4L

3.7 重组蛋白的纯化

为了验证杆状病毒系统表达重组蛋白情况, 并使用 NI-NTA 亲和层析柱纯化, 通过 SDS-PAGE 分析, 成功得到 rBacmid-gp64-E146L (图 2-6A) 在 24.6 kDa, 蛋白浓度为 0.72 mg/mL; rBacmid-gp64-E19L (图 2-6B) 在 31.3 kDa, 蛋白浓度为 0.4 mg/mL; rBacmid-gp64-M448R (图 2-6C) 在 61.3 kDa, 蛋白浓度为 0.32 mg/mL; rBacmid-gp64-I177L (图 2-6D) 在 17 kDa, 蛋白浓度为 0.88 mg/mL; rBacmid-gp64-MGF110-4L (图 2-6E) 在 22.7 kDa, 蛋白浓度为 0.2 mg/mL, 经过 Snapgene 软件分析, 与预期蛋白大小相符。

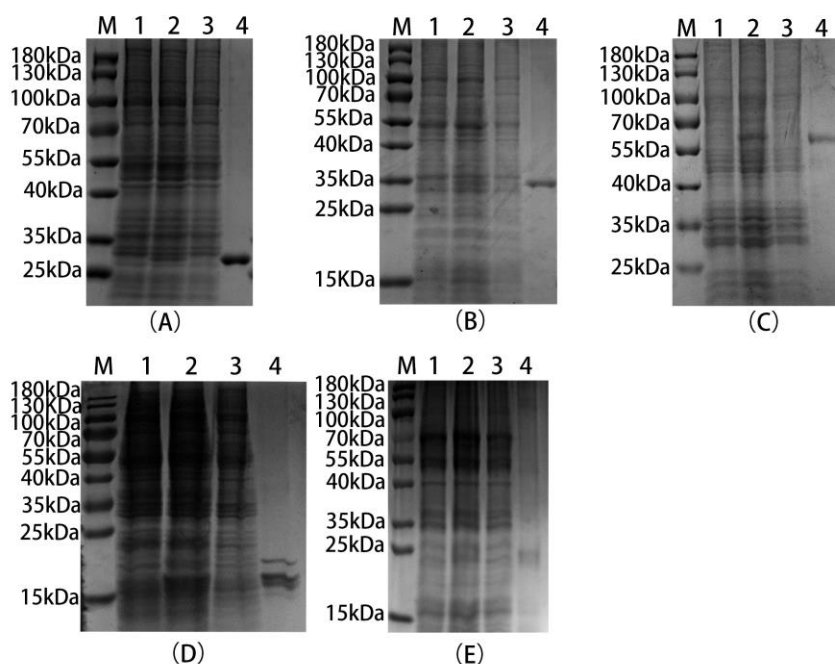


图 2-7 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定图

Figure 2-7 SDS-PAGE analysis of expression of recombinant proteins

注：(A) rBacmid-gp64- E146L (M: Marker; 1: sf9 细胞阴性对照; 2: 接毒后 sf9 细胞; 3: 洗涤液; 4: 纯化后蛋白 (下同)); (B) rBacmid-gp64-E199L; (C) rBacmid-gp64-M448R; (D) rBacmid-gp64-I177L; (E) rBacmid-gp64- MGF110-4L

4 讨论

1983 年, BEVS 首次在昆虫细胞上表达人干扰素 β (IFN- β), 这一成果标志着 BEVS 在基因表达领域的应用正式开启^[5]。在过去的 30 多年内, 因为其表达高水平蛋白质的能力, 成为了重要的基因表达工具。研究发现, BEVS 合成蛋白的具有翻译后修饰和正确折叠^[6], 不会出现不溶性或者错误折叠的重组蛋白^[7], 能促进表达的蛋白折叠和糖基化、磷酸化一系列蛋白翻译加工后修饰, 让表达蛋白更接近于天然蛋白活性。此外, 杆状病毒可以在昆虫细胞繁殖至高滴度, 从而易于制备大量重组蛋白, 而且这些蛋白大部分是可溶性的。最后, 杆状病毒基因组很大, 可以容纳较大的外来 DNA 片段。且杆状病毒只感染节肢动物, 具有高度特异的宿主范围, 不会对操作人员造成生物危害^[8], 是一种良好的蛋白表达系统^[9]。

gp64 病毒膜融合信号肽是协助病毒感染细胞的重要蛋白, 在病毒进入细胞

过程中, gp64 介导受体的识别和低 pH 引发的膜融合, 一旦病毒感染细胞后, gp64 会与细胞膜融合形成包膜融合蛋白, 从而完成病毒感染过程。此外, gp64 可以激活 sf9 细胞本身的分泌蛋白能力, 增强蛋白表达量, 是 BEVS 系统一种良好的分子佐剂^[10, 11]。

由于 BEVS 拥有诸多的优势, 所以在研制 ASF 疫苗中, 杆状病毒载体倍受青睐。Barderas 等人用杆状病毒表达 p30/p54, 对试验猪进行融合免疫。结果显示, 试验猪对 ASFV (E75) 具有出色的抵抗力, 所有试验猪均存活, 且血液中 ASFV 滴度显著降低, 同时在血清中都检测到了中和抗体^[12]。结果表明, 在研发 ASF 疫苗过程中选择具有保护作用的抗原并进行科学配伍至关重要。另一方面, Ruiz-Gonzalvo 等人利用杆状病毒表达 CD2v, 表达的蛋白配合弗氏佐剂乳化后免疫试验猪。结果发现, 该疫苗能够保护试验猪免受 ASFV (E75) 致命的感染, 但是没有产生中和抗体^[13]。这表明, ASFV 保护性免疫中, 需要保护作用的非中和抗体因子的参与, 并且可能还有 CD2v 诱导的抗体参与, 这些抗体可以抑制 ASFV 吸附红细胞, 从而降低病毒在机体内扩散的能力。这些数据不仅为后续了解 ASFV 抗原保护性机制提供理论基础, 也为后续 ASF 杆状病毒载体疫苗研发提供实践经验。

因为 ASFV 的抗原基因数量庞大, 所以选择具有保护性的抗原是研发 ASF 疫苗的关键。研究发现, M448R 蛋白能诱导机体产生特异性 T 细胞, 与 ASFV 感染受损的 RNA 产生免疫反应, 参与病毒发生免疫逃避^[14, 15]。Goatley 等人用 E199L 与其他 7 个 ASFV 抗原使用腺病毒载体对试验猪进行免疫, 发现攻毒后试验猪得到了完全的保护, 并且 E199L 参与 ASFV 合成, 缺乏 E199L 蛋白的 ASFV 早期被阻止蛋白表达, 与 ASFV 的完整和感染性密切相关^[16, 17]。E146L 与其他 11 个 ASFV 抗原能有效刺激机体产生特异性抗体, 增加 IFN- γ 分泌, 并且在攻毒后降低病毒滴度和减轻临床症状^[18], 是一种具有潜在保护力的 ASFV 抗原。I177L 是 ASFV 毒力基因, 是首个能完全产生无排毒反应的疫苗株^[19], 并且缺失该基因的 ASFV 能够在 BMDM 细胞中显著降低病毒复制能力^[20]。MGF110-4L 与其他 17 种抗原能够诱导试验猪机体产生较强的体液免疫, 并且与对照组相比, 试验猪病毒血症症状减轻^[18]。以上 5 种基因在 ASFV 保护性免疫中具有良好前景, 因此选择 M448R、E199L、E146L、I177L、MGF110-4L 进行重组表达。

本研究采用 BEVS 表达系统, 构建了信号肽 gp64 和 ASFV 基因融合表达的

杆状病毒转移载体，杆状病毒转移载体经过转座重组形成杆状病毒载体，提取杆状病毒质粒转染 sf9 细胞，获得 rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 重组蛋白。经过 Western blot 验证结果表明，重组杆状病毒蛋白在 sf9 细胞中得到表达，通过 NI-NTA 亲和层析对重组蛋白进行纯化，得到了较为纯净的目标蛋白，为后续 ASFV 真核表达亚单位疫苗的制备及 ASFV 血清抗体检测奠定基础。

参考文献

- [1] 鲍春晖. 非洲猪瘟 P54 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定 [D]; 扬州大学, 2023.
- [2] CM Thompson, E Petiot, A Mullick, et al. Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems [J]. BMC Biotechnol, 2015, 15: 31.
- [3] J Chen, J Wang, J Zhang, et al. Advances in development and application of influenza vaccines [J]. Front Immunol, 2021, 12: 711997.
- [4] 李如梦. 基于重组杆状病毒昆虫细胞悬浮培养系统的 H7N9 VLP 新型疫苗的研究 [D]; 扬州大学, 2021.
- [5] GE Smith, MD Summers, MJ Fraser. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. Mol Cell Biol, 1983, 3(12): 2156-65.
- [6] EA Mckenzie, WM Abbott. Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells [J]. Methods, 2018, 147: 40-9.
- [7] WH Brondyk. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein [J]. Methods Enzymol, 2009, 463: 131-47.
- [8] AC Chambers, M Aksular, LP Graves, et al. Overview of the baculovirus expression system [J]. Curr Protoc Protein Sci, 2018, 91: 5 4 1-5 4 6.
- [9] TA Kost, JP Condreay, DL Jarvis. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(5): 567-75.
- [10] GW Blissard, GF Rohrmann. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the oryza pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus [J]. Virology, 1989, 170(2): 537-55.
- [11] Q Yu, GW Blissard, TX Liu, et al. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus GP64 protein: analysis of domain I and V amino acid interactions and membrane fusion activity [J]. Virology, 2016, 488: 259-70.
- [12] MG Barderas, F Rodriguez, P Gomez-Puertas, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant african swine

- p>fever virus proteins [J]. Arch Virol, 2001, 146(9): 1681-91.
- [13] F Ruiz-Gonzalvo, F Rodriguez, JM Escribano. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of african swine fever virus [J]. Virology, 1996, 218(1): 285-9.
 - [14] M Amitsur, R Levitz, G Kaufmann. Bacteriophage t4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA [J]. EMBO J, 1987, 6(8): 2499-503.
 - [15] A Martins, S Shuman. Characterization of a baculovirus enzyme with RNA ligase, polynucleotide 5'-kinase, and polynucleotide 3'-phosphatase activities [J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18220-31.
 - [16] S Chen, X Zhang, Y Nie, et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2 [J]. Virol Sin, 2021, 36(2): 196-206.
 - [17] LC Goatley, AL Reis, R Portugal, et al. A pool of eight virally vectored african swine fever antigens protect pigs against fatal disease [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(2).
 - [18] CL Netherton, LC Goatley, AL Reis, et al. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1318.
 - [19] MV Borca, E Ramirez-Medina, E Silva, et al. Development of a highly effective african swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain [J]. J Virol, 2020, 94(7).
 - [20] Y Liu, Z Xie, Y Li, et al. Evaluation of an I177L gene-based five-gene-deleted african swine fever virus as a live attenuated vaccine in pigs [J]. Emerg Microbes Infect, 2023, 12(1): 2148560.

第三章 原核表达 ASFV 重组蛋白猪的免疫试验

在 ASFV 保护性免疫机制中, 体液和细胞免疫的协同作用是不可或缺的。因此, 在 ASF 亚单位疫苗的研制过程中, 诱导机体产生强烈的体液和细胞免疫应答是重要的研究方向。例如, ASFV 抗原 I177L 可能诱导机体产生中和抗体, 并且参与抑制病毒的侵袭和释放^[1], 在体液免疫中起到重要作用。然而, 在 ASFV 保护性免疫中, 不仅需要体液免疫的参与, 细胞免疫同样重要。IFN 是病毒感染过程中主要由单核细胞和淋巴细胞产生的蛋白质, 可以激活多种抗病毒免疫信号并且对生物学功能进行免疫调节, 是机体抗病毒的关键因子。研究发现, IFN 可以触发多种 IFN 诱导基因和 MHC 的产生, 显著降低感染猪病毒血症的病毒滴度, 有效抑制 ASFV 在靶细胞中的复制^[2]。因此, 在 ASF 亚单位疫苗的研制过程中, 需要考虑如何同时诱导机体产生强烈的体液和细胞免疫应答, 以实现 ASFV 的有效预防和控制。

本研究选用第一章构建表达的重组蛋白, 将 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 5 种重组蛋白混合液配合弗氏佐剂制备亚单位疫苗, 进一步评价该亚单位疫苗对猪的免疫效果。为了评估重组蛋白在引发体液免疫方面的效果, 本研究选取了第二章所表达的 5 种抗原, rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L, 作为检测材料, 了解血清中特异性抗体的产生情况。

本实验通过检测免疫后血液中淋巴细胞增殖、细胞因子和血清特异性抗体, 评估重组蛋白免疫试验猪所产生的体液和细胞免疫效果, 为后续该类疫苗的系统性评价奠定重要基础。

1 材料

1.1 蛋白、病毒、实验动物

本研究的 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 重组蛋白为第

一章进行制备并保存；rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 重组蛋白为第二章制备并保存。

1.2 实验试剂

表 3-1 主要试剂和试剂盒
Table 3-1 The main reagents and kits

主要试剂和试剂盒	公司
刀豆蛋白 (ConA)、白介素-10 (IL-10)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-2 (IL-2)	北京索莱宝科技有限公司
CCK8 溶液、TMB 显色液	上海碧云天生物技术有限公司
肝素钠抗凝剂	广州鸿泉生物公司
猪外周血单个核细胞分离液	天津灏洋生物制品科技有限公司

1.3 主要试剂配制

抗原包被液：Na₂CO₃ 0.79 g、NaHCO₃ 147 g 加入超纯水中，定容至 500 mL，调 pH 至 9.6。

封闭液：脱脂乳 5 g 溶解于 100 mL PBST 中，4℃短暂保存。

反应终止液 (2 M H₂SO₄)：吸取浓硫酸(98%) 21.7 mL，缓慢加入 178.3 mL 超纯水中，室温保存。

2 方法

2.1 动物免疫试验

将 pET30a- M448R-I73R-Hsp70c (F1)、pET30a- p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5) 5 种重组抗原进行均匀混合 (按每种蛋白 200 μ g)，随后混合液与弗氏佐剂以 1: 1 比例乳化后制备亚单位疫苗。其次，开展猪体内试验。将试验猪分为 PBS 对照组和免疫组 (n=15)，采用颈部肌肉注射途径对猪只进行三次免疫 (1 d, 8 d 和 28 d)，第三次剂量加

倍。分别于首免后 21 d、45 d、60 d、75 d 和 90 d 对猪只进行颌下静脉采血，提取血清用于 ASFV 特异性抗体检测，从抗凝血中分离猪外周血淋巴细胞用于淋巴细胞增殖试验和细胞因子测定试验。

2.2 猪血清特异性抗体检测

2.2.1 猪血清处理

将 5 mL 收集猪全血的离心管放入离心机 3000 g 离心 20 min，将上层微黄色的血清层收集至新的离心管中，分装保存至 -80℃。

2.2.2 血清特异性抗体检测

- (1) 实验开始前配制好：包被缓冲液、洗涤液、稀释液。
- (2) 酶标板中加入 100 μ L 稀释好的重组蛋白，置于冰箱过夜包被。
- (3) 将酶标板从冰箱拿出，室温放置 1 h 左右，每个孔加入 100 μ L 洗涤液，洗涤 3 次。
- (4) 每个孔加入 100 μ L 脱脂乳封闭 1 h。
- (5) 将封闭液吸干净，每个孔加入 100 μ L 洗涤液，洗涤 3 次。
- (6) 每个孔加入 100 μ L 稀释的血清（以 100、200、400、800、1600、3200、6400、12800 为顺序），酶标板设置空白组和阴性对照组，空白组不添加血清，阴性组添加 PBS 组的猪血清，放置 37℃ 温度中 1 h。
- (7) 每个孔加入 100 μ L 洗涤液，洗涤 3 次。加入对应的抗猪 HRP 抗体，放置 37℃ 温度中 1 h。
- (8) 每个孔加入 100 μ L 洗涤液，洗涤 3 次。每个孔加入显色液 100 μ L，等待 10 min 左右，加入 50 μ L 终止液，使用酶标仪测定 OD₄₅₀ 大小。

2.3 猪淋巴细胞增殖检测

2.3.1 猪外周血淋巴细胞分离

将采集的抗凝猪血用天津灏洋公司的猪外周血单个核细胞分离液试剂盒提取淋巴细胞，具体步骤如下：

- (1) 取一支无菌 15 mL 离心管，加入 6 mL 淋巴细胞分离液，后缓慢加入

等量的抗凝血，让抗凝血置于淋巴细胞分离液之上达成分层效果，400 g，离心 20 min。

(2) 离心后，此时离心管由上往下分为四层。第一层为血浆层，第二层为环状乳白色淋巴细胞层，第三层为分离液层，第四层为红细胞层。

(3) 用吸管缓慢吸取淋巴细胞层至新的无菌 15 mL 离心管中，加入清洗液 5 mL 缓慢清洗淋巴细胞，250 g 离心 10 min。

(4) 弃上清，重复清洗一次淋巴细胞。

(5) 加入 10% FBS 和 1% 细胞用抗生素的 1640 培养基至淋巴细胞中轻轻混匀重悬，并细胞计数铺板。

2.3.2 淋巴细胞增殖实验

对淋巴细胞进行计数，96 孔板每个孔加入 100 μ L 含有 2.5×10^5 细胞数的培养基。阳性孔加入 100 μ L ConA(终浓度为 5 μ L/mL)；检测组加入 100 μ L 浓度 100 μ g/mL 的蛋白；空白对照组加入 100 μ L 1640 培养基。将加完样品的培养板放入 37°C 培养箱中等待 72 h。等待时间结束后，每孔加入 CCK8 溶液，在 37°C 恒温下孵育 2 h，用酶标仪检测 OD₄₅₀。

2.3.3 细胞因子检测

用相应抗原刺激 ASFV 重组蛋白免疫猪的淋巴细胞。刺激淋巴细胞步骤与淋巴细胞增殖实验相同。收集刺激后的细胞上清液，分装保存。用索莱宝公司的细胞因子检测试剂盒检测样品，具体步骤如下：

(1) 拿出检测酶标板，放在常温下等待 30 min，每孔加 100 μ L 洗涤液清洗 3 次。

(2) 加入刺激的细胞上清样品，每孔加入 100 μ L，常温下 100 g 孵育 1 h，孵育完成后用洗涤液清洗 4 次。

(3) 每孔加入 100 μ L 生物素化抗体，常温下孵育 1 h，完成孵育后用洗涤液清洗 4 次。

(4) 每孔加入 100 μ L 酶结合物，常温下孵育 25 min，完成孵育后用洗涤液清洗 4 次。

(5) 在暗光环境下，每孔加入 100 μ L 显色液，常温下孵育 10 min。

(6) 显色完毕后，加入 50 μ L 终止液，用酶标仪检测 OD₄₅₀。

2.4 数据的统计和分析

使用 Graphpad Prism 7 软件制作统计图, 用双尾 t 检验分析 (Two-tailed t test) 分析重组蛋白免疫实验组与对照组之间的差异显著性, *和**分别表示 $P<0.05$ (差异显著)、 $P<0.01$ (差异极显著)。

3 结果

3.1 特异性抗体水平检测结果

为了探究试验猪免疫重组蛋白后体液免疫应答情况, 本研究使用前期制备的 rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 重组蛋白, 通过间接 ELISA 检测不同时期试验猪血清的抗体产生水平。如图 3-1 所示, E199L、E146L、M448R、I177L、MGF110-4L 抗体均能在一免后 21 d 极显著增加 ($P<0.01$), 在 45 d 和 60 d 逐渐升高 ($P<0.01$), 并且在 60 d 达到最高的抗体水平。最后, 在 75 d 和 90 d, 抗体水平依然保持着极显著增加的趋势 ($P<0.01$)。

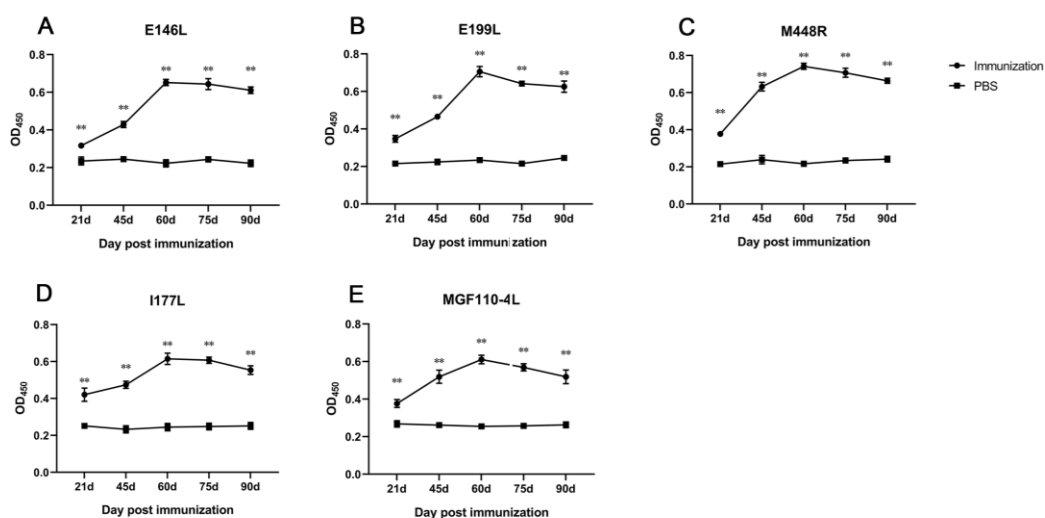


图 3-1 血清中特异性抗体的检测

Fig. 3-1 Detection of specific antibodies in serum

(A) E146L 抗体检测结果; (B) E199L 抗体检测结果; (C) M448R 抗体检测结果;

(D) I177L 抗体检测结果; (E) MGF110-4L 抗体检测结果

(A) E146L antibody test results;(B) E199L antibody test results;(C) M448R antibody test results;(D) I177L antibody test results;(E) MGF110-4L antibody test results

*代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异显著 ($P < 0.05$);

**代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异极显著 ($P < 0.01$)

3.2 淋巴细胞增殖水平检测结果

为了解试验猪免疫重组蛋白后淋巴细胞增殖情况,本研究中使用相应抗原刺激淋巴细胞后,采用 CCK8 检测淋巴细胞增殖水平,如图 3-2 所示,首免后 21 d 免疫组(混合抗原刺激)淋巴细胞增殖能力极显著增加($P < 0.01$),免疫组(F5 抗原刺激)淋巴细胞增殖能力显著增加($P < 0.05$);首免后 60 d,免疫组(混合抗原刺激)淋巴细胞增殖能力极显著增加($P < 0.01$),免疫组(F1/F2/F3/F4/抗原刺激)淋巴细胞增殖能力显著增加($P < 0.05$)。首免后 90 d,免疫组(混合抗原刺激)淋巴细胞增殖能力极显著增加($P < 0.01$),免疫组(F1/F2/F3/F4/F5 抗原刺激)淋巴细胞增殖能力有上升趋势,但不显著增加($P > 0.05$)。

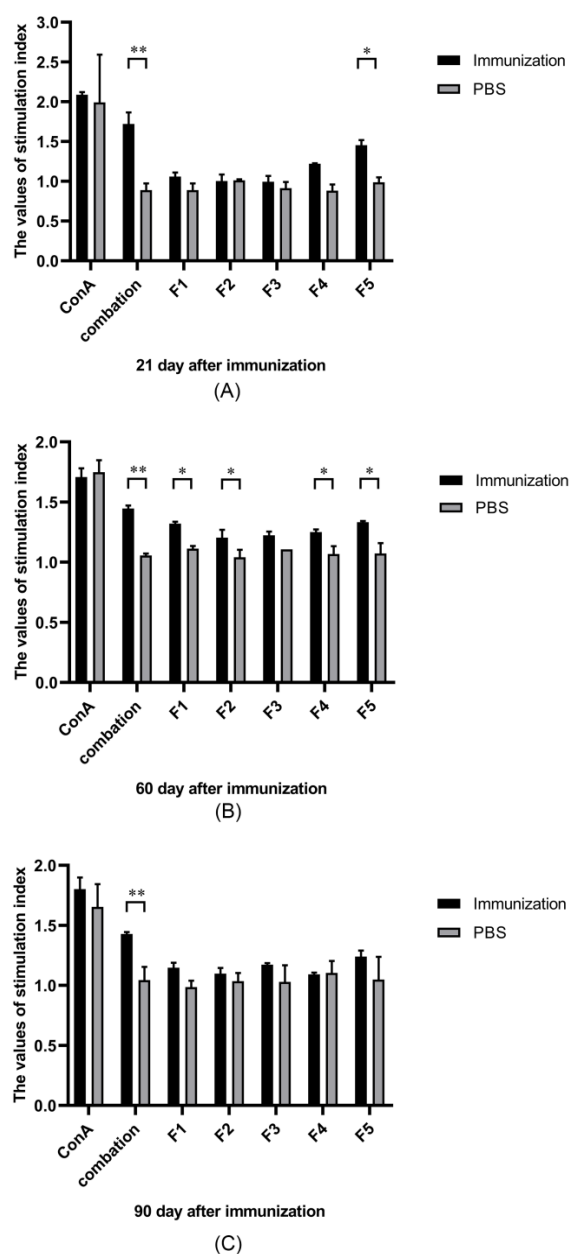


图 3-2 重组蛋白组合免疫猪淋巴细胞增殖水平检测结果

Figure 3-2 Detection result of lymphocyte proliferation level in pig immunized with recombinant protein

(A) 21 天淋巴细胞增殖检测结果; (B)60 天淋巴细胞增殖检测结果; (C)90 天淋巴细胞增殖检测结果

(A) 21-day lymphocyte proliferation test results;(B) 60-day lymphocyte proliferation test results;(C) 90-day lymphocyte proliferation test results

*代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异显著 ($P < 0.05$);

**代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异极显著 ($P < 0.01$)

3.3 细胞因子水平检测结果

为了解试验猪免疫重组蛋白后细胞因子产生情况，本研究在猪外周血淋巴细胞用组合抗原（F1/F2/F3/F4/F5）刺激后，如图 3-3，与 PBS 组相比，免疫组首免后 21 d，细胞因子 IFN- γ 、IL-10 显著上升（ $P<0.05$ ）；首免后 60 d 和 90 d，细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 均显著上升（ $P<0.05$ ）。各细胞因子在首免后 60 d 达到最高峰。

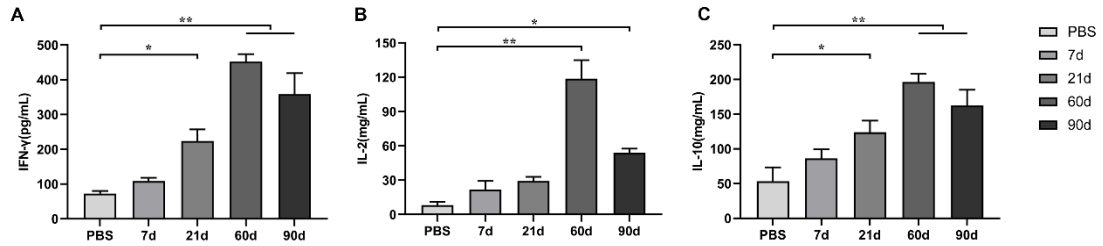


图 3-3 重组蛋白免疫猪后 IL-10 和 IL-2、IFN- γ 水平检测结果

Fig 3-3 Detection results of IL-10, IL-2, and IFN- γ levels after immunization with recombinant protein in pigs

(A) IFN- γ 检测结果；(B) IL-2 检测结果；(C) IL-10 检测结果

(A) IFN- γ test results;(B) IL-2 test results;(C) IL-10 test results

*代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异显著（ $P<0.05$ ）；

**代表相同时间点重组蛋白免疫组与对照之间差异极显著（ $P<0.01$ ）

4 讨论

疫苗诱导机体产生的免疫应答，通常通过检测体液和细胞免疫来评价疫苗的免疫效力。本研究通过检测特异性抗体来评价体液免疫应答水平，通过检测淋巴细胞增殖和细胞因子来评价细胞免疫应答水平。

将制备的重组蛋白 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c（F1）、pET30a-p37-I177L-Hsp70c（F2）、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c（F3）、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c（F4）、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜（F5）混合液与弗氏佐剂乳化免疫试验猪 3 次，对试验猪进行颌下静脉采血，提取血清用于 ASFV 特异性抗体检测，从抗凝血中分离猪外周血淋巴细胞用于淋巴细胞增殖试验和细胞因子测定试验。

ELISA 检测 ASF 血清是 OIE 推荐的方法，具有操作简单，检测速度快，对检测设备要求低等优点。并且 ELISA 由于检测成本低廉，可以检测大规模样本，

适合大批量检测,目前国内外已经研发出一些 ASV 商品化检测试剂盒^[3-5]。本研究使用杆状病毒系统表达的重组蛋白 rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L 建立间接 ELISA 检测方法,分别检测不同时期试验猪血清的特异性抗体水平。结果显示, E199L、E146L、M448R、I177L、MGF110-4L 检测抗原均能在 1 免后 21 d 检测到相应的特异性抗体,在 45 d 和 60 d 逐渐升高,60 d 时达到峰值。结果表明,本次试验中的重组蛋白 (F1/F2/F3/F4/F5) 能够有效激发试验猪体内强烈的体液免疫应答。在三免后的第 32 d 达到了最高的水平,这一发现与李辉等人的研究结果相吻合^[6],并且较高的抗体水平最少维持 30 d。其中, M448R 能够诱导机体产生特异性抗体,并且在机体感染 ASFV 后减少病毒载量的能力^[7]。其他研究发现, E146L、E199L 与其他抗原可以诱导机体产生较高的体液免疫,并且可以减轻发病时临床症状^[1, 8]。I177L 是首个能完全产生无排毒反应的疫苗株^[9],并且在 BMDM 上能够减轻 ASFV 复制能力^[10]。综上所述,这些因素可能是诱导机体产生较高体液免疫应答的重要原因。

T 淋巴细胞在体液免疫和细胞免疫都有重要作用,在体液免疫中,将抗原递呈给 B 淋巴细胞,刺激淋巴细胞释放,增强 B 淋巴细胞免疫应答。在细胞免疫中,通过与靶细胞特异性结合破坏靶细胞膜,对靶细胞进行破坏。ASFV 抗原 M448R 与 C129R,与宿主免疫逃逸有关,能够影响机体的细胞免疫反应^[11, 12]。而 MGF110-5L、I125L、E146L 等抗原在免疫试验猪后能引发显著的 IFN- γ 反应和体液免疫^[1]。此外, F317L 抗原在宿主先天免疫反应中展现出拮抗作用,尽管它引发的体液免疫反应相对较低,但能引发较强的细胞免疫应答^[13]。综上所述,这些抗原都具有诱导机体产生细胞免疫应答的潜力。本研究发现,通过首免后 21 d、60 d、90 d 免疫猪进行的淋巴细胞增殖检测,在特异性抗原的刺激下,各免疫组刺激指数明显高于 PBS 对照组,表明组合抗原 (F1/F2/F3/F4/F5) 可以提高试验猪的细胞免疫应答水平。并且,组合抗原 (F1/F2/F3/F4/F5) 比单个抗原刺激效果更佳明显,说明组合抗原能更全面的刺激机体免疫系统,产生强烈的免疫应答。

IFN- γ 和 IL-2 都是 Th-1 类细胞因子,IFN- γ 能参与机体细胞免疫,增强抗原呈递作用,还能活化 NK 细胞,增强杀死肿瘤和对抗病毒的作用,从而提高机体免疫监视功能。IL-2 具有刺激 T 淋巴细胞增殖分化的能力^[14]。本研究发现 IFN- γ 和 IL-2 在首免后 7 d、21 d、60 d 逐步提升,第 60 d 最高,表明接种重组蛋白

后机体的细胞免疫应答得到了增强。IL-10 是 Th-2 类细胞因子，促进 Th-2 细胞增殖，激活 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞分泌^[6]。本研究发现 IL-10 在首免后 7 d、21 d、60 d 逐步提升，第 60 d 最高，在第 90 d 依然有着较高表达，表明上述疫苗可以有效激发 Th2 型免疫应答，降低机体炎症反应，增强机体体液免疫应答。其中细胞因子 IFN- γ 表达量较高，可能是 p37、E146L、MGF110-5L、I125L 等抗原诱导产生了较高水平的细胞免疫应答，与 Netherton 和 Zajac 研究结果相符^[1, 15]。

本研究已通过第一章所制备的了 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c(F1)、pET30a-p37-I177L-Hsp70c (F2)、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c (F3)、pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c (F4)、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c 去跨膜 (F5)，5 种以大肠杆菌为载体的重组蛋白对试验猪进行了免疫试验，结果显示这些重组蛋白具有诱导机体产生较高 ASFV 特异性抗体和细胞免疫应答的能力。在之后研究中，可以进一步筛选有效的抗原构建亚单位疫苗，优化不同组合抗原、选择不同的表达载体系统、优化免疫剂量、筛选配伍佐剂等来提高疫苗免疫效力，为进一步研发 ASF 亚单位疫苗提供依据。

参考文献

- [1] CL Netherton, LC Goatley, AL Reis, et al. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1318.
- [2] 国师榜. 非洲猪瘟病毒的分离、生物学特性研究及抗病毒药物的筛选 [D]; 华中农业大学, 2023.
- [3] LG Gimenez-Lirola, L Mur, B Rivera, et al. Detection of african swine fever virus antibodies in serum and orai fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161230.
- [4] J Carlson, L Zani, T Schwaiger, et al. Simplifying sampling for african swine fever surveillance: assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(1): e165-e72.
- [5] P Sastre, C Gallardo, A Monedero, et al. Development of a novel lateral flow assay for detection of african swine fever in blood [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 206.
- [6] 李辉. 表达 ASFV 保护性抗原重组腺病毒的构建及其在猪体内的免疫效果研究 [D]; 扬州大学, 2024.
- [7] L Bosch-Camos, E Lopez, J Collado, et al. M448R and MGF505-7R: two african swine fever virus antigens commonly recognized by ASFV-specific T-cells and with protective potential [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(5).
- [8] LC Goatley, AL Reis, R Portugal, et al. A pool of eight virally vectored african swine fever antigens protect pigs against fatal disease [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(2).
- [9] MV Borca, E Ramirez-Medina, E Silva, et al. Development of a highly effective african swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain [J]. *J Virol*, 2020, 94(7).
- [10] Y Liu, Z Xie, Y Li, et al. Evaluation of an I177L gene-based five-gene-deleted african swine fever virus as a live attenuated vaccine in pigs [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(1): 2148560.
- [11] M Amitsur, R Levitz, G Kaufmann. Bacteriophage t4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA [J]. *EMBO J*, 1987, 6(8): 2499-503.

- [12] N Dodantenna, L Ranathunga, WaG Chathuranga, et al. African swine fever virus EP364R and C129R target cyclic GMP-AMP to inhibit the cGAS-STING signaling pathway [J]. J Virol, 2022, 96(15): e0102222.
- [13] JK Jancovich, D Chapman, DT Hansen, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank african swine fever virus immunogenic and protective proteins [J]. J Virol, 2018, 92(8).
- [14] 刘雪婷. 表达 ASFV 保护性抗原重组腺病毒的构建及免疫效力评价 [D]; 中国农业科学院, 2021.
- [15] MD Zajac, N Sangewar, S Lokhandwala, et al. Adenovirus-vectored african swine fever virus pp220 induces robust antibody, IFN-gamma, and CTL responses in pigs [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 921481.

全文总结

1. 成功构建了 pET30a-M448R-I73R-Hsp70c、pET30a-p37-I177L-Hsp70c、pET30a-MGF110-4L-MGF110-5L-I125L-Hsp70c 、 pET30a-A151R-CP129R-E146L-Hsp70c、pET30a-E199L-F317L-Hsp70c（去跨膜），通过诱导表达和纯化，获得了纯度高的 5 个原核重组蛋白。
2. 成功构建了杆状病毒 rBacmid-gp64-M448R、rBacmid-gp64-E199L、rBacmid-gp64-E146L、rBacmid-gp64-I177L、rBacmid-gp64-MGF110-4L，在 sf9 细胞上表达蛋白，进一步纯化获得了纯度高的 5 个真核表达重组蛋白。
3. 5 种原核重组蛋白在免疫猪上均能引起较强的细胞和体液免疫反应。首免后 21 d、60 d、90 d，在组合抗原刺激下，淋巴细胞增殖能力显著增强；淋巴细胞分泌的细胞因子 IL-2、IL-10、IFN- γ 在首免后 21 d、60 d 逐步提升，在 60 d 效果最好；在首免后 21 d 检测到相应的特异性抗体 M448R、E199L、E146L、I177L，在 45 d 和 60 d 逐渐升高，60 d 时达到峰值。