

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

非洲猪瘟病毒 p72 单克隆抗体的制备及抗体 化学发光检测法的建立

硕士研究生：苗春

学号：82101205532

指导教师：常惠芸 研究员

申请学位类别：兽医硕士

领域：兽医

培养单位：兰州兽医研究所

研究生院

2023年6月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Preparation of Monoclonal Antibody against African Swine Fever Virus P72 and Establishment of Chemiluminescence Immunoassay Detection Method

Candidate: MIAO Chun

Student ID: 82101205532

Supervisor: Professor CHANG Huiyun

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

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Lanzhou Veterinary Research
Institute**

Graduate School

June 2023

摘要

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）引起的一种高度传染性、致死性的动物疾病。自 1921 年在肯尼亚首次发现至今已有百年历史，由于没有安全有效的疫苗，防控十分困难。尽管我国采取了严格的防控措施，该病还是于 2018 年传入我国，给养猪业及相关产业造成了巨大的损失。利用灵敏的检测技术快速、准确诊断 ASF，是及时扑灭传染源，切断传播途径，有效控制 ASF 的必不可少的技术手段。因此，开发简便、快速、灵敏的 ASFV 检测方法对于有效防控、净化 ASFV 至关重要。

本研究以 ASFV p72 蛋白为研究对象，利用生物信息学技术优化 p72 基因及载体序列，构建原核重组表达质粒，通过大肠杆菌表达、亲和纯化获得 p72 重组蛋白，用弗氏完全佐剂和不完全佐剂乳化后免疫 BALB/c 小鼠。利用经典杂交瘤技术获得 p72 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞 17 株，并通过表位绘图法从 p72 蛋白上鉴定出 7 个线性 B 细胞表位，其中有 4 个线性表位：²⁴⁹HKPHQSKPIL²⁵⁸、⁶⁹PVGFYEYENKV⁷⁷、¹⁹⁵VNGNSLDEYSS²⁰⁵和 ²²³GYKHLVGVQEV²³³为首次发现。进一步序列分析结果显示，这 7 个表位在 9 种基因型的 27 个 ASFV 毒株中高度保守，提示这些抗原表位的单克隆抗体是建立特异性检测 ASFV 感染的良好试剂。为了获得可用于 ASFV 检测的最佳单克隆抗体，利用竞争 ELISA（cELISA）方法对上述单抗进行了筛选，结果显示，单克隆抗体（2B8D7 株）的免疫灵敏性强、特异性好，适合用于建立 ASFV 免疫学检测方法。

为了建立简单、灵敏、快速的 ASFV 免疫学检测方法，用上述确定的单抗（2B8D7 株）建立检测 ASFV p72 蛋白抗体的单抗阻断化学发光检测法，通过棋盘滴定法优化反应条件，最终确定该检测方法的程序为：抗原包被浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，血清样品稀释度为 1:5，酶标单抗为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，反应时间为 20 min+20 min。并用背景清楚的猪血清评价了该检测法的特异性、敏感性、灵敏度、重复性等。结果显示，该方法的 Cut-off 值为 40% 时，敏感性为 100%，特异性为 99.5%，而不与 PCV2、PPV、FMDV、PRRSV、PDCOV、CSFV 和 PEDV 等 7 种病毒的阳性血清发生交叉反应，提示敏感性好、特异性强。试剂盒比对实验结果显示，本方法检测特异性为 100%，商品试剂盒的检测特异性为 92.5%，说明本研究建立的检测方法性能更好。

总之，本研究获得的 p72 特异性单克隆抗体为建立敏感特异性检测方法，进行病毒蛋白与宿主交互、病毒定位等应用和基础研究奠定了物质基础；获得的高度保守的线性 B 细胞表位为研究表位疫苗提供了理论依据和材料；建立的 ASFV p72 蛋白抗体的单抗阻断化学发光检测法，是一种性能更好的快速新型 ASFV 免疫学检测方法，将为我国防控、净化 ASF 提供物质保障和技术支撑，具有重要的意义。

关键词：非洲猪瘟，p72，单克隆抗体，表位，化学发光

Abstract

African swine fever (ASF) is a highly contagious and fatal animal disease caused by African swine fever virus (ASFV). It has been a hundred years since it was first discovered in Kenya in 1921. Because there is no safe and effective vaccine, it is very difficult to prevent and control it. Although China has taken strict prevention and control measures, the disease was introduced into China in 2018, causing huge losses to the pig industry and related industries. Using sensitive detection technology to diagnose ASF quickly and accurately is an essential technical means to extinguish the source of infection in time, cut off the transmission route and effectively control ASF. Therefore, it is very important to develop a simple, rapid and sensitive detection method for preventing and purifying ASFV effectively.

In this study, ASFV p72 protein was taken as the research object, and the sequence of p72 gene and vector was optimized by bioinformatics technology, and a prokaryotic recombinant expression plasmid was constructed. The recombinant protein was obtained by *E. coli* expression and affinity purification, and then emulsified with Freund's complete adjuvant and incomplete adjuvant to immunize BALB/c mice. Seventeen hybridoma cells with monoclonal antibodies against p72 protein were obtained by classical hybridoma technique, and seven linear B-cell epitopes were identified from p72 protein by epitope mapping method, among which four linear epitopes: ²⁴⁹HKPHQSKPIL²⁵⁸, ⁶⁹PVGFYENKV⁷⁷, ¹⁹⁵VNGNSLDEYSS²⁰⁵ and ²²³GYKHLVGQEV²³³ were found for the first time. Further sequence analysis showed that these seven epitopes were highly conserved among 27 ASFV strains of 9 genotypes, suggesting that monoclonal antibodies against these epitopes were good reagents for establishing specific detection of ASFV infection. In order to obtain the best monoclonal antibody for ASFV detection, the above monoclonal antibodies were screened by competitive ELISA (cELISA). The results showed that the monoclonal antibody (2B8D7 strain) had strong immune sensitivity and good specificity, and was suitable for establishing an immunological detection method for ASFV.

In order to establish a simple, sensitive and rapid immunological detection method for ASFV, a monoclonal antibody blocking chemiluminescence detection method for detecting ASFV p72 protein antibody was established with the above-mentioned monoclonal antibody (2B8D7 strain), and the reaction conditions were optimized by chessboard titration. Finally, the procedure of this detection method was determined as follows: antigen coating concentration was 1 µg/mL, serum sample dilution was 1:5, enzyme-labeled monoclonal antibody was 0.5 µg/mL, and reaction time was 20 min. The specificity, sensitivity, sensitivity and repeatability of the detection method were evaluated with pig serum with clear background. The results showed that when the Cut-off value of this method was 40%, the sensitivity was 100% and the specificity was 99.5%, and it did not cross-react with the positive sera of 7 viruses, such as PCV2, PPV, FMDV, PRRSV, PDCOV, CSFV and PEDV, which indicated that it was sensitive and specific. The experimental results of kit comparison show that the detection specificity of this method is 100%, and the detection specificity of commercial kit is 92.5%, which shows that the detection method established in this study has better performance.

In a word, the p72-specific monoclonal antibody obtained in this study laid a material foundation for

the establishment of sensitive and specific detection methods, the application and basic research of virus protein-host interaction and virus localization. The highly conserved linear B cell epitopes obtained provide theoretical basis and materials for the study of epitope vaccines. The established monoclonal antibody blocking chemiluminescence detection method for ASFV p72 protein antibody is a rapid and novel immunological detection method with better performance, which will provide material guarantee and technical support for the prevention, control and purification of ASF in China, and is of great significance.

Keywords: African swine fever, P72, MAbs, Eptiopes, Chemiluminescence

目 录

第一章 引言.....	1
1.1 非洲猪瘟概述.....	1
1.1.1 非洲猪瘟病毒的形态结构.....	1
1.1.2 ASFV 的理化特性.....	2
1.1.3 ASFV 基因型与血清群.....	2
1.1.4 ASFV 主要结构蛋白及其功能.....	2
1.2 非洲猪瘟流行病学.....	3
1.3 实验室诊断技术.....	4
1.3.1 病原检测.....	4
1.3.2 核酸检测.....	5
1.3.3 抗体检测.....	8
1.3.4 抗原检测.....	9
1.4 化学发光免疫分析技术.....	9
1.5 研究目的和意义.....	11
第二章 ASFV p72 单克隆抗体的制备.....	12
2.1 材料.....	12
2.1.1 细胞、质粒及实验动物.....	12
2.1.2 主要试剂与仪器.....	12
2.1.3 主要试剂配制.....	12
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 目的基因合成.....	12
2.2.2 p72-SUMO 重组质粒的构建.....	13
2.2.3 p72 重组蛋白的表达和纯化.....	14
2.2.4 免疫动物.....	14
2.2.5 p72 单抗的制备.....	15
2.3 结果.....	15
2.3.1 p72-SUMO 重组质粒的双酶切鉴定.....	15
2.3.2 p72 重组蛋白的表达纯化与鉴定.....	16
2.3.3 mAb-2B8D7 单抗的纯化.....	17
2.3.4 17 单克隆抗体的亚型鉴定.....	17
2.4 讨论.....	18
第三章 ASFV p72 表位的鉴定及初步应用.....	20
3.1 材料.....	20
3.1.1 质粒、细胞.....	20

3.1.2 主要实验试剂与仪器.....	20
3.2 实验方法.....	20
3.2.1 间接免疫荧光法 (IFA).....	20
3.2.2 p72 肽片段的表达.....	21
3.2.3 序列比对.....	21
3.2.4 SDS-PAGE 和 WB	22
3.2.5 中和试验.....	22
3.2.6 竞争 ELISA (c ELISA).....	22
3.3 结果.....	22
3.3.1 17 株单克隆抗体的反应性.....	22
3.3.2 表位的表达与鉴定.....	23
3.3.3 保守性分析.....	26
3.3.4 中和试验.....	27
3.3.5 单克隆抗体的初步应用.....	27
3.4 讨论.....	28
第四章 针对 ASFV p72 单克隆抗体化学发光法的建立.....	30
4.1 材料.....	30
4.1.1 实验试剂及仪器.....	30
4.1.2 血清样本.....	30
4.2 实验方法.....	30
4.2.1 p72-CLIA	30
4.2.2 p72-CLIA 检测血清样本.....	31
4.2.3 Cut-off 值、诊断敏感性(Dsn)、诊断特异性(Dsp)的确定	31
4.2.4 p72-CLIA 与商品化试剂盒检测性能对比.....	31
4.2.5 p72-CLIA 灵敏度、重复性、交叉反应性实验.....	31
4.3 结果.....	32
4.3.1 p72-CLIA 的最佳检测条件.....	32
4.3.2 p72-CLIA Cut off 值、Dsn、Dsp 的确定.....	33
4.3.3 p72-CLIA 与商品化试剂盒检测性能对比.....	33
4.3.4 p72-CLIA 灵敏度、重复性、特异性实验.....	34
4.4 讨论.....	35
第五章 全文结论	37
参考文献.....	38
附录 A.....	48

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino acids	氨基酸
Amp ⁺	Ampicillin	氨苄抗生素
ASF	African swine fever	非洲猪瘟
ASFV	African swine fever virus	非洲猪瘟病毒
BTV1	Bluetongue Virus	蓝舌病毒
CBS	Carbonate buffered saline	碳酸盐包被液
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟病毒
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	化学发光免疫分析
Dsn	Diagnostic sensitivity	诊断敏感性
Dsp	Diagnostic specificity	诊断特异性
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光实验
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
WB	Western blot	蛋白免疫印迹

第一章 引言

1.1 非洲猪瘟概述

1.1.1 非洲猪瘟病毒的形态结构

非洲猪瘟 (frican swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种急性、接触性和致病性传染病, 是目前已知唯一的 DNA 虫媒病毒 (GAUDREAU et al., 2020; RUIZ-SAENZ et al., 2022)。ASFV 为大型线性双链 DNA 分子 (DIXON et al., 2013), 编码 68 种结构蛋白和 150-200 种非结构蛋白 (WANG et al., 2021d)。ASFV 粒子为二十面体的多层结构, 从外到内分别是外囊膜、衣壳、内膜、内核心壳和内核 (WANG et al., 2019; WANG et al., 2021d) (图 1-1)。囊膜为 ASFV 的最外层结构, 不仅可以保护病毒, 而且可以促进病毒感染 (MERCER et al., 2010; ZHANG et al., 2021b)。CD2v 是 ASFV 外膜蛋白特征性的蛋白之一, 也是目前研究热门, 由于猪红细胞表面具有 CD2v 配体, 因此它可以特异性介导红细胞吸附从而促进病毒在宿主体内扩散。其在 ASFV 感染发病机制中可能与免疫逃避和增强宿主病毒复制有关 (JIA et al., 2017)。外囊膜下一层为衣壳, 可使病毒核酸免受环境中核酸酶或其他理化因素的破坏, p72 为 ASFV 的主要衣壳蛋白, 占整个病毒颗粒的 31% -33%, 主要参与病毒衣壳组装 (WANG et al., 2019), 在病毒吸附和侵袭易感细胞中起重要作用 (ANDRÉS et al., 2020)。p72 也是一种高免疫原性的病毒蛋白, 在不同的毒株中高度保守, 并在 ASFV 诊断中被用作抗原。衣壳下面是内膜, 单脂质双层结构, 其中含有的膜蛋白可参与核心壳二十面体结构的组装 (HAWES et al., 2008)。核心壳是包裹基因组的厚蛋白层, 具有保护病毒基因组免受宿主核酸酶以及宿主 dsDNA 传感器影响的作用 (ANDRÉS et al., 2020)。此外, 内核是含有基因组的类核层, 基因组长约为 17-19 万个碱基, 末端为发卡环结构, 紧邻末端的是由串联重复序列和多基因家族构成的可变区域 (SHIMMON et al., 2021)。ASFV 经内吞作用后, ASFV 基因组递送到细胞质后可启动早期病毒基因的转录, 以促进病毒的复制 (CAKETT et al., 2020)。

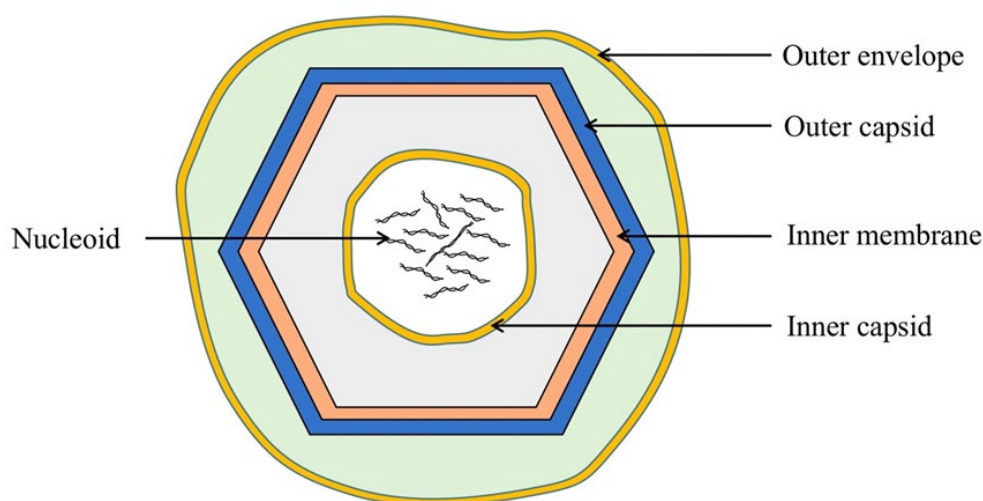


图 1-1 非洲猪瘟病毒结构示意图 (引自 YANG et al., 2023)

Fig. 1-1 Schematic diagram of the ASFV structure

1.1.2 ASFV 的理化特性

根据研究表明, ASFV 具有双层囊膜结构, 因此具有较强的环境抵抗力, 不仅在较低的温度及酸碱中都能表现出较高的抵抗力, 而且可以使病毒免受环境中蛋白酶的破坏 (KALMAR et al., 2018)。此外, ASFV 耐高温, 在 56°C 时, 需要 70 min 才可灭活, 在 60°C 时, 仍需要 20 min 便可灭活。ASFV 对乙醚、氯仿、2%-3% 次氯酸盐溶液及 2% 氢氧化钠等消毒剂敏感 (BEATO et al., 2022)。有研究表明, 血清可使 ASFV 在环境中更稳定及存活时间更长 (KALMAR et al., 2018)。

1.1.3 ASFV 基因型与血清群

根据 ASFV p72 蛋白编码基因 B646L C 端序列约 500 bp 核苷酸差异能将 ASFV 分离株分为 24 种基因型。在中国流行的毒株主要是基因 II 型, Sun 等 (SUN et al., 2021) 在 2021 年报道中国出现了基因 I 型毒株。为了更好地区分生物学相关的表型, 进一步研究 ASFV 毒株的多样性和抗原变异性, 根据编码蛋白 CD2v 的 EP402R 基因的系统发育分组, 将分离株分为九个血清群 (SG) (QU et al., 2022)。

1.1.4 ASFV 主要结构蛋白及其功能

1.1.4.1 p72

p72 蛋白由 B646L 基因编码, 是组成病毒粒子的衣壳主要成分, 约占病毒粒子 31%-33% (WANG et al., 2019)。p72 蛋白的表达发生在感染后的晚期。据 Liu 等 (LIU et al., 2019) 的研究, p72 只有与 B602L 共同表达时, 才能获得正确折叠和组装的 p72, 并且正确折叠的 p72 三聚体刺突的外表面有大量带电残基, 因此 p72 具有高热稳定性。同时, 对来自其他 ASFV 毒株的 B646L 基因序列比较表明, p72 基因高度保守, 由于其高度保守性和免疫原性, p72 被认为是血清学诊断的重要靶标 (GALLARDO et al., 2009)。

1.1.4.2 CD2v

CD2v 蛋白由 EP402R 基因编码, 是一种跨膜糖蛋白, 是红细胞与受感染细胞结合所必需的蛋白 (JIA et al., 2017)。因其与 T 细胞表面粘附受体 CD2 高度相似而命名为 CD2v。CD2v 由一个信号肽区、一个胞外域 (包含两个免疫球蛋白区)、一个跨膜区、一个酸性区和一个富含脯氨酸的区域组成 (ALONSO et al., 2018)。CD2v 蛋白是唯一可以在病毒体表面检测到的病毒蛋白, 是一种重要的保护性抗原。根据研究表明, 删除 EP402R 可显著降低病毒的红细胞吸附现象 (BORCA et al., 2020)。此外, CD2v 还参与细胞间粘附、毒力增强和免疫应答调节, 并且其在 ASFV 感染、免疫逃避和增强病毒复制中的作用已得到证实 (ROWLANDS et al., 2009)。

1.1.4.3 p54

p54 蛋白由 E183L 基因编码, 是一种 II 型跨膜蛋白, 具有保守肽区和可变肽区。p54 蛋白之间的变异性主要取决于蛋白质 C 端 Pro-Ala-Ala-Ala 重复序列的数量, 基因变异有助于将病毒分

类为不同的基因型 (RODRIGUEZ et al., 1994)。p54 对病毒形态发生和病毒活力至关重要 (RODRIGUEZ et al., 2004), 参与病毒的早期感染, 能诱导产生保护性免疫反应, 病毒内化后, p54 与宿主动力蛋白 LC8 相互作用, 使病毒转运到细胞的核周区域 (HERNÁEZ et al., 2010), 同时 p54 也参与了诱导 caspase-3 的激活和细胞凋亡 (RODRIGUEZ et al., 2004)。

1.1.4.4 p30

p30 蛋白由 CP204L 基因编码, 是病毒感染表达的早期膜蛋白。该蛋白参与 ASFV 进入宿主细胞, 具有高度抗原性 (SÁNCHEZ et al., 2013)。通常在感染后约 2-4 h 蛋白开始表达, 并持续整个感染周期。因此, p30 的表达表明病毒已经进入宿主细胞并脱壳 (LITHGOW et al., 2014)。之前的研究表明, p30 在病毒感染的早期被翻译, 并能在猪体内引起强烈的免疫反应 (PETROVAN et al., 2019; REIS et al., 2007)。

1.2 非洲猪瘟流行病学

ASFV 是目前唯一已知的 DNA 虫媒病毒, 不同类型的家猪和野猪 (包括疣猪、灌木猪、野猪) 是 ASFV 的储存宿主, 不同类型的软蜱为 ASFV 宿主, 主要通过家猪-野猪、野猪-软蜱-猪之间传播, 也可通过直接和间接接触或短距离气溶胶传播。

ASFV 最早于 1921 年在肯尼亚被报道, 发生在撒哈拉以南非洲国家, 随后, 传播到西欧、拉丁美洲和东欧国家 (GAUDREAU et al., 2020)。到 20 世纪 90 年代中期, ASFV 在美洲和欧洲已经被根除, 但撒丁岛仍然存在 (COSTARD et al., 2009)。2014 年, ASFV 传入俄罗斯和东欧 (VERGNE et al., 2016)。2018 年 8 月, 中国辽宁省首次爆发 ASF, ASF 疾病在亚洲爆发, 迅速席卷了中国大部分省份, 截至 2020 年 7 月 24 日, 31 个省共发生 189 例 ASF 疫情, 疫情主要集中于生猪产业贸易频繁的主要经济区, 尤其是西南地区和东北地区的疫情最严重 (TAO et al., 2020; WU et al., 2020b), 各省累计报告至少有 170 万头生猪被扑杀, 造成了数百亿的直接经济损失。非洲猪瘟的爆发导致我国生猪及其相关产业遭受了毁灭性打击。目前, ASF 的传播仍在东南亚地区传播, 包括泰国、菲律宾等其它国家 (CADENAS-FERNÁNDEZ et al., 2022; ISCARO et al., 2022; RAMIREZ-MEDINA et al., 2022), 此外, 塞尔维亚、希腊和其它欧洲国家也报告了 ASF 疫情。目前该病毒仍在全球广泛传播 (图 1-2)。



图 1-2 世界地图显示的 2021 年 ASFV 的分布情况 (OIE, 2021)

Fig. 1-2 World map shows the distribution of the ASFV in 2021 according to the OIE

1.3 实验室诊断技术

1.3.1 病原检测

1.3.1.1 病毒分离鉴定

ASFV 感染动物后，主要在单核巨噬细胞系统（单核细胞和巨噬细胞）中复制，并通过淋巴系统和血液循环系统扩散到肝、肾等器官。根据 OIE 手册要求，ASFV 分离必须在 BSL-3 及以上生物安全实验室进行，且需要从血液、脾脏、肝脏、淋巴结和扁桃体等组织样本中分离病毒，用于下一步的实验室诊断 (MALMQUIST and HAY, 1960)。

1.3.1.2 红细胞吸附试验 (haemadsorption test, HAD)

红细胞吸附性是在 1960 年由 Malmquist 和 Hay 首次发现的 (MALMQUIST and HAY, 1960)。ASFV 会粘附于猪的单核细胞或巨噬细胞表面，产生特征性的“玫瑰花环”现象。采集发病猪的血液或组织悬液接种到猪原代骨髓细胞 (PBM)、原代白细胞或肺泡巨噬细胞中进行培养，通常，如果样本呈强烈阳性，则会在培养后 24~48 h 出现血液吸附而形成特征性的“玫瑰花环”现象 (张丽 等, 2019)。虽然该方法敏感性高、成本低，但需要进行原代细胞培养，时间周期长，而且现已分离出少量“非血吸附”的 ASFV，其中大多数是低毒性的，不产生红细胞吸附现象，所以 HAD 不再是检测 ASFV 的首选方法，一般将 HAD 与病毒分离鉴定作为 ELISA、PCR 或 FAT 阳性结果确认的参考试验 (OURA et al., 2013)。

1.3.2 核酸检测

1.3.2.1 PCR (Polymerase chain reaction)

PCR 全称为聚合酶链式反应, 由变性、退火、延伸 3 个基本反应步骤构成, 其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 用于检测血液、血清或器官样本中的 ASFV 基因组, 在 ASFV 感染早期就可通过 PCR 检测到 ASFV。病毒脱氧核糖核酸的小片段可通过 PCR 扩增到可检测的数量。该方法快速、敏感性高、特异性强。Agüero 等 (AGÜERO et al., 2003) 发现, ASFV 引物集可以与 CSFV 的特定引物集相结合, 采用多重反转录 PCR (RT-PCR) 方法, 可以在 1 次反应中同时区分并检测两种病毒基因组。然而, PCR 的高敏感性也使样品易于交叉污染, 从而导致假阳性结果。为此, Luo 等 (LUO et al., 2017) 基于 GenBank 中所有 ASFV 毒株 vp72 基因序列的高度保守区, 设计了 ASFV 特异性引物, 建立了 PCR 检测方法, 并与两个 OIE 验证的 PCR 检测进行了比较, 结果表明灵敏性和特异性都高于 OIE 推荐的 PCR 方法。

1.3.2.2 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)

qPCR 是通过对体系中加入的荧光基团产生的信号进行实时收集积累, 最后用标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。与基于凝胶的常规 PCR 方法相比, qPCR 方法具有快速、灵敏度高、不容易交叉污染, 以及可以定量分析的优点, 现已成为病原学诊断中应用最广泛的方法。King 等 (KING et al., 2003) 首次根据 ASFV 的 VP72 基因设计特异性引物和探针, 建立了一种 TaqMan qPCR 来快速检测 ASFV DNA, 灵敏度在 10~100 个分子之间, 并针对不同地区 25 株代表 9 个基因型 (I、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X) 的 ASFV 分离株和 16 个非洲、欧洲蜚分离株进行了验证, 结果没有发现与相关的猪病毒发生交叉反应。Zsak 等 (ZSAK et al., 2005) 也基于 VP72 基因建立了一种实时 TaqMan PCR 方法, 可以通过使用便携式检测仪器实时获得检测结果, 从而简化聚合酶链反应操作程序。该方法比 OIE 推荐的常规 PCR 和实时荧光定量 PCR 具有更高的灵敏度。现已成为病原学诊断中应用最广泛的方法。

1.3.2.3 多重 PCR (multiplex polymerase chain reaction, mPCR)

多重 PCR 是在常规 PCR 的基础上进行改进的, 其在本身体系结构中增添更多的引物来进行扩增, 因目标片段之间有着较大的差异性, 所以通过凝胶成像能直接进行分析, 是一种应用范围更广、更加有效的 PCR 新技术 (闫倩倩, 2021)。Giammarioli 等 (GIAMMARIOLI et al., 2008) 基于猪瘟病毒 (CSFV)、ASFV、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪细小病毒 (PPV) 基因组设计特异性引物, 开发了一种新的热启动 mPCR 方法, 可同时检测猪的多种病毒感染。

1.3.2.4 微滴数字 PCR (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)

ddPCR 是第三代 PCR 技术, 可以在不使用标准样品的情况下绝对定量核酸。它通过对样品进行微滴化处理, 经 PCR 扩增后, 对每个微滴进行检测, 最后根据泊松分布原理及阳性微滴的

个数与比例得出靶分子的起始拷贝数或浓度。该方法更精确、更数字化，灵敏度更高。Wu 等 (WU et al., 2018) 基于 ASFV K205R 基因的高度保守区域设计特异性引物和 TaqMan 探针，建立了一种准确、灵敏的 ASFV ddPCR 检测方法。ddPCR 的最小检测限约为 10 拷贝/反应，而 qPCR 的检测限为 10^2 拷贝/反应，因此 ddPCR 的检测灵敏度是 qPCR 的 10 倍。

1.3.2.5 巢式 PCR (nested-PCR)

巢式 PCR 涉及两组引物，用于连续两次的聚合酶链反应，第二组引物用于扩增第一批产物中的第二个靶标，一般适用于一些有必要增加灵敏度和/或特异性的 PCR 反应。Basto 等 (BASTO et al., 2006) 首次建立了一种带有内部对照的巢式 PCR 检测方法，用于检测不同蜂种中的 ASFV DNA。通过蜂类中 ASFV 感染状态，有助于确定该地区有无 ASFV 感染。

1.3.2.6 环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

LAMP 是用于 DNA 扩增的单管技术，使用两套或三套引物和一种具有复制活性、高链置换活性的聚合酶，可在 15~60 min, 60~65°C 的恒定温度下扩增靶序列，是一种更简便、快速、精确，且成本低的扩增方法。Wang 等 (WANG et al., 2020) 设计了针对 ASFV p10 基因的 LAMP 引物，并用伪狂犬病病毒 (PRV)、PCV2、CSFV、PRRSV、PPV 和 ASFV 的 DNA 或 cDNA 检测实时 LAMP 和可视化检测的特异性，证实 LAMP 可以准确和特异性检测 ASFV。Zhu 等 (ZHU et al., 2020) 通过将 Hive-Chip 和 LAMP 相结合，设计针对 5 个 ASFV 基因 (B646L、B962L、C717R、D1133L 和 G1340L) 的 LAMP 引物，并将其预固定在 Hive-Chip 中，结果发现靶基因之间没有交叉反应。该方法无需核酸提取，不依赖精密仪器，可避免因病毒的单个基因突变引起的假阴性问题，且灵敏度高、特异性强，检测结果可视化。Wang 等 (WANG et al., 2021c) 根据 ASFV P72 基因高度保守区域设计引物，建立以中性红为显色指示剂的视觉 LAMP 检测方法，其特异性高，不与其他猪病毒出现交叉反应，与 OIE 推荐的 qPCR 方法敏感度相当。

1.3.2.7 重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA)

RPA 技术是由 Piepenburg 等 (PIEPENBURG et al., 2006) 在 2006 年建立的一种等温核酸扩增技术。该技术不需要模板的热变性，反应温度为 37~42°C，扩增反应时间一般为 10~20 min。Miao 等 (MIAO et al., 2019) 开发了一种将 ASFV p72 基因的 RPA 与侧流检测 (LFD) 相结合的快速检测方法。RPA-LFD 法对 ASFV 具有高度灵敏性和特异性，并且与 CSFV 等其他猪病毒没有交叉反应。哈登楚日亚等 (哈登楚日亚等, 2017) 建立了 ASFV 实时荧光 RPA 检测方法。该方法在 39°C，20 min 内可检测 10 个拷贝的 DNA 分子，并且与 CSFV、PCV2、PPV、PRV 都无交叉反应，可用于 ASFV 的定性检测。Wang 等 (WANG et al., 2021e) 也将 RPA 与 LFD 相结合，开发了一种用于 ASFV 现场诊断的金纳米颗粒试纸条，称为侧向流动基因检测 (lateral flow gene assay, LFGE)。该方法使用尾部引物来产生一端具有单链尾部的双链体。该双链体与金纳米粒子 (AuNP) 标记的探针杂交，使标记在检测探针上的金纳米粒子在试纸条的测试线上显示红色带，即为阳性。在较低的反应温度和较短的反应时间下，LFGE 可以特异性区分 ASFV 和 CSFV，检测限为 10^2 拷贝/ μL ，灵敏度与琼脂糖凝胶电泳相当，整个操作过程不需要任何昂贵的仪器，快

速、特异,操作简单,对 ASFV 的早期诊断非常有帮助。目前,随着 CRISPR/Cas 技术的不断发展,已经有研究 (BAI et al., 2019)将 RPA 和 CRISPR/Cas12a 相结合来实现更高的灵敏度,并提供了对条带的高灵敏度荧光检测。这在实现多基因检测的同时,为更灵敏、更快速的 ASFV 诊断提供了启示。

1.3.2.8 交叉引物扩增技术 (cross-priming amplification, CPA)

CPA 是一类等温核酸扩增反应,利用交叉引物和探针,能够在 1 h 内扩增出至少 4 个拷贝的基因组 DNA,具有高度特异性。CPA 方法依赖于具有链置换活性的 DNA 聚合酶,通过链置换进行核酸扩增。该技术是我国首个具有自主知识产权的核酸扩增技术 (朱智壕 等, 2015)。Frączyk 等 (FRĄCZYK et al., 2016)基于 p72 基因,设计了一组 CPA 引物,可以特异性检测猪和野猪血液、血清样本中的 ASFV DNA 以及 CSFV DNA,无需提取 DNA,无交叉反应性,检测灵敏度与 qPCR 一致。CPA 高度敏感,可在水浴中进行,无需使用热循环器。这种快速检测技术为储存、运输和销毁怀疑感染 ASFV 病毒的材料提供了更好的生物安全措施 (FRĄCZYK et al., 2016)。

1.3.2.9 原位杂交技术 (in situ hybridization, ISH)

ISH 就是将标记的核酸探针与细胞或组织中的核酸进行杂交,目前已发展出荧光原位杂交技术以及多彩色荧光原位杂交技术。荧光原位杂交技术克服了放射性探针检测周期长且危害人体健康的缺点,被广泛应用于基因定位、染色体识别等研究中。Bentolila 等 (BENTOLILA and WEISS, 2006)进行了小鼠的量子点多彩色荧光原位杂交,发现 QD-FISH 探针可穿透完整的间期细胞核和中期染色体,并显示出对致密染色质结构域的良好靶向,且空间位阻最小,表明 QD-FISH 探针在多色 FISH 应用中十分有效。Ballester (BALLESTER et al., 2010)开发了一种新 ISH 法,使用地高辛标记探针,来鉴定用福尔马林固定、石蜡包埋组织中的 ASFV 基因组,检测效果良好。

1.3.2.10 生物传感器技术

该方法通过生物识别元件识别分析物,然后换能器将生物识别元件捕获目标分析物后发生的反应转换成等效信号,最后由检测器系统将信号进行处理和分析,从而得到分析结果 (肖芳斌 等, 2019)。Biagetti 等 (BIAGETTI et al., 2018)利用 DNA/LNA 探针作为 ASFV vp72 基因保守区的互补识别元件,建立了一种基于生物传感器的方法来检测猪血液中的 ASFV。检测限 (LOD)和定量限 (LOQ)分别为 178 拷贝/ μL 和 245 拷贝/ μL ,该结果和 OIE 推荐的 qPCR 敏感性相当。该方法可用于 ASF 初步诊断的筛选,具有快速、简便、成本低的优点。Wu 等 (WU et al., 2020a)将 PCR、Cas12a 和侧流生物传感器 (LFB)结合起来,基于 Cas12a 的生物传感器靶向不同 ASFV 菌株中 VP73 基因的保守区域,同时检测 7 种不同基因型的 ASFV 病毒。该方法具有极高特异性和灵敏性,而且操作简便、价格低,可以普遍用于检测 ASFV 和其他病毒。

1.3.3 抗体检测

1.3.3.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

ELISA 是目前血清检测最常用的方法,也是 OIE 指定的 ASF 首选血清学诊断方法。ELISA 的敏感性、特异性高、操作方便快捷,适用于检测多头猪样本,能够快速检测群体中的 ASFV 抗体。但是,当检测样品发生降解或在 -20°C 放置太长时间,ELISA 检测的灵敏度就会降低。目前,常用作检测 ASFV 抗原的蛋白有 p30、p54、p72、pp62 等。Gallardo 等 (GALLARDO et al., 2006) 通过使用杆状病毒表达 p30、p54 和 pp62 重组蛋白建立的重组 ELISA 检测方法,不仅显示出比 OIE 推荐方法 (ELISA) 更高的灵敏度,而且还减少了检测出假阳性的概率,极大程度提高了检测的准确性。Giménez-Lirola (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2016) 等基于多重荧光微珠的免疫测定法 (FMIA) 对 ASFV 的三种重组多肽 (p30, p54, p72) 感染猪后产生的早期血清抗体进行比较,选择最佳候选抗原,结果发现 p30 是早期诊断最佳抗原,并通过表达 ASFV p30 蛋白,开发了一种能够检测血清或口腔液标本中 ASFV 抗体的间接酶联免疫吸附试验 (I-ELISA),其对两种样本类型都具有高度特异性,而且在 8 DPI 时,就可以检测到口腔液抗体,与 OIE 推荐的 I-ELISA 敏感度相当。

1.3.3.2 间接荧光抗体试验 (indirect fluorescent anti-body test, IFA)

IFA 是一种免疫标记技术,通过与抗原抗体复合物中的抗体结合而检测未知抗原。Heimerman 等 (HEIMERMAN et al., 2018) 通过对 ASFV 感染的 Vero 细胞进行免疫荧光抗体 (IFA) 染色,并对其中的 IFA 阳性抗体进行表征,结果显示这些抗体均位于 p72 的高度保守区域,这为开发抗体和抗原检测方法提供新方法。Wu 等 (WU et al., 2020c) 开发了一组针对 ASFV p30 的 mAb,并对其中进行 IFA 检测,结果表明这些抗原区域在宿主抗体反应中高度保守并具有免疫优势,为 ASF 血清学检测的开发提供了新工具。

1.3.3.3 胶体金快速免疫层析法 (gold immunochromatography assay, GICA)

GICA 是一种以胶体金颗粒标记的抗原或抗体作为标志物,以纤维素膜用作载体的免疫标记技术。吴海涛等 (吴海涛等, 2018) 以硝酸纤维素 (NC) 膜上分别包被的 ASFV p72 多克隆抗体和 SPA 作为检测线和质控线,制备了用于检测 ASFV 的胶体金免疫试纸条。该试纸条在 10 min 内就可以检测出阳性抗原,敏感性和特异性良好,而且具有高度稳定性,在 ASFV 临床检测中有良好的应用前景。

1.3.3.4 免疫印迹法 (immunoblotting Test, IBT)

IBT 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳区分待测样品不同组分,在电流作用下,使蛋白质从凝胶转移至固相载体 (膜) 上,通过特异性抗体作为探针 (ALCARAZ et al., 1995),对靶抗原蛋白质进行检测分析。Alcaraz 等 (VIDAL et al., 1997) 通过利用大肠杆菌表达系统表达重组蛋白 p54,首次建立了 ASFV 重组蛋白的 IBT 法,并展现出高度的特异性和敏感性,而且避免了假阳性结果

的出现以及在抗原生产中使用活病毒。

1.3.4 抗原检测

1.3.4.1 荧光抗体试验 (fluorescent antibody test, FAT)

FAT 是检测抗原的一种辅助方法,可以鉴别“非红细胞吸附”的毒株,可作为 HAD 试验的补充实验进行进一步检测(王涛等, 2018)。FAT 需用荧光素对抗原进行标记,但对荧光素的特异性要求较高,非特异性的荧光素染色会造成假阳性结果;对于急性 ASF 检出率较高,对于亚急性和慢性 ASF 的检出率仅为 40%;对人员要求较高,需要荧光显微镜,不适用于现场检测(OURA et al., 2013)。

1.3.4.2 抗原 ELISA

ELISA 通过抗体和抗原的结合,再加入相应的酶标抗体或抗原,形成酶标免疫复合物,加入底物后,根据颜色反应判定结果。Vidal 等(VIDAL et al., 1997)基于抗 VP73 单克隆抗体建立了一种用单克隆抗体检测猪样品中 ASFV 蛋白的改良固相酶联免疫吸附试验,其检测限低于普通 ELISA 试验的检测最低限(0.5 $\mu\text{g/mL}$)。

1.3.4.3 侧向流动免疫色谱分析 (lateral flow assay, LFA)

LFA 又称“试纸条”测定方法,是近几年来发展比较迅速的试纸条快速检测技术,其以条状纤维层析材料为固相,借助毛细管的吸附作用使样品在层析材料上移动,样品中的待测物与层析材料上一定区域的配体发生特异性的免疫结合反应,通过可目测标记物的显色反应短时间获得直观测试结果(WANG et al., 2017; 钟友好等, 2014)。Sastre 等(SASTRE et al., 2016)基于 ASFV vp72 蛋白的单克隆抗体建立的一种用于抗原检测的 LFA,其灵敏度与市售抗原 ELISA 试验相当。该法具有快速、特异性高、经济且易于使用的优点。此外,该法可直接用于检测血液,非常适合现场检测,及实验室基础设施不足甚至缺乏的国家。

1.4 化学发光免疫分析技术

化学发光物质被催化剂催化以完成基态向激发态的转变,之后再从高能的激发态变回基态,这种以发射光子的形式来释放能量的过程被称作化学发光。1961 年, Berson 等(BERSON and YALLOW, 1961)将放射性同位素标记检测与抗原-抗体免疫反应结合创立了放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)技术,该方法开创了检测微量物质的先河。1977 年, Halmann 等(HALMANN et al., 1977)在 RIA 和酶免疫分析(EIA)理论的基础上,加入了化学发光技术,建立了化学发光免疫分析技术。该技术消除了放射性污染,并以其高的敏感性、低的干扰、宽的线性范围等优点,被广泛应用于诊断检测中(MIRASOLI et al., 2014)。并且,随着近些年来一些新技术,如磁珠、试纸条层析、毛细管电泳以及高效液相色谱等的不断发展,使化学发光技术更加先进与完善,极大的增加了敏感性与特异性,并缩短了检测时间与检测费用(WANG et al., 2012)。

化学发光根据反应原理的不同又可分为化学酶免发光体系 (Chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)、电化学发光体系 (Electro chemiluminescence immunoassay, ECLIA) 和直接化学发光体系 (Chemiluminescence immunoassay, CLIA)。

CLEIA 的发光物是酶, 用酶如辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP), 标记抗原或是抗体。CLEIA 具有广泛的应用。刘伟等 (刘伟, 2020) 利用口蹄疫病毒 O 型 VP1 的重组多表位蛋白建立了一种快速检测猪 O 型口蹄疫病毒抗体间接 CLIA 试剂盒, 该试剂盒相较于市售 ELISA 试剂盒具有更高的灵敏性以及检出率。Ashenagar 等 (ASHENAGAR et al., 2022) 使用 CLEIA 对全球严重急性呼吸系统综合冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 疫苗第一剂和第二剂接种后的抗体反应进行监测, 结果表明 CLEIA 在抗体水平低浓度的范围内, 相较于酶联免疫吸附测定 (ELISA), 具有很好的灵敏度。Salvagno (SALVAGNO et al., 2022) 等使用自动 CLEIA 快速检测具有多种变体的 SARS-CoV-2 的抗原, 以定量评估鼻咽拭子或唾液中存在的 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白, 结果表现出很好的灵敏度以及特异性, 表明使用 CLEIA 检测 SARS-CoV-2 抗原是一种十分可靠的方法。

ECLIA 是以电化学反应来间接启动化学发光反应的检测技术, 是对化学发光免疫分析的继承和发展 (RICHTER, 2004)。ECLIA 包括了电化学反应以及化学发光反应这两个过程, 其中三联吡啶钌 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 作为目前应用最广泛的标记物 (金茂俊等, 2012)。Kolesova 等 (KOLESOVA et al., 2022) 通过 ECLIA 检测 SARS CoV 2 抗原, 结果展现出 85% 的敏感性和 100% 的特异性, 表明 ECLIA 似乎是一种快速筛查高 SARS-CoV-2 病毒载量患者的合适方法。Tiwari 等 (TIWARI et al., 2020) 对 10,164 名印度献血者的人类免疫缺陷病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 和乙型肝炎病毒 (HBV) 的 TTD 标记物的进行了 ECLIA 检测, 结果表明 ECLIA 对所有三种 TTD 标记的灵敏度均为 100%, 而对 HIV 的特异性为 99.85%; HCV 为 99.84 %, HBV 为 99.70 %。Teimouri 等 (TEIMOURI et al., 2018) 使用 ECLIA 对人血清中抗弓形虫 IgG 进行了检测, 并与 ELISA 的测定结果进行了比较, 结果发现 ECLIA 相较于 ELISA 能够更快的对样品进行检测, 并且具有更高的敏感性与特异性, 更适用于一线血清学筛选试验。电化学发光独特的机理使其具有良好的重复性和极高的精密度等优势, 然而 ECLIA 的检测需要配套的昂贵设备和试剂, 成本较高, 不适宜在现场使用, 特别是在农村地区或设备较少的实验室。

CLIA 是将发光物直接标记在抗原或抗体上, 无需电催化或酶催化, 仅在碱性条件下即可释放光子, 具有光信号强度高, 光信号释放迅速, 干扰条件少等优势。与现在应用较为广泛的 ELISA 相比, 它的实验操作更加的简单, 检测时间更短, 搭配全自动化的检测分析仪器, 能够同时进行大批量样本的检测 (任世奇等, 2008), 极大的提高了检测效率, 并能够减少人为操作上造成的误差, 使结果更加可信。Kombe Kombe 等 (KOMBE KOMBE et al., 2022) 开发了基于 CLIA 的诊断试剂盒以检测水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 特异性免疫球蛋白滴度, 该诊断方法显示出对 VZV-糖蛋白 E 的特异性 IgA、IgG 和 IgM 的敏感性分别为 95.2%、95.2% 和 97.6%, 特异性分别为 98.0%、100% 和 98.9%。将 IgM 与 IgG 和 IgA 检测相结合提高了诊断准确性, 并且在极低免疫球蛋白滴度下, CLIA 的诊断方法总体上比 ELISA 更敏感, 并且与 ELISA 相比具有更高的特异性。此外, Liu (LIU et al., 2018) 等开发了一种特异及灵敏的自动 CLIA 方法来检测 SARS-CoV-2 中和抗体 (NAb) 水平, 结果表明该测定方法可用于严重急性呼吸系统综合冠状病毒-2 (SARS-CoV-2) 感染的诊断、治疗和疫苗评估。CLIA 在人类医学、动物医学等各领域疾病的预防及诊断

中的应用，离不开其自身的诸多优点。同时，其作为一种综合性的检测技术，逐渐在各个不同的检测领域中成为分析技术中的主流技术，持续发挥着重要作用。

1.5 研究目的和意义

ASF 是一种危害家猪及野猪的毁灭性疾病。自 2018 年 8 月在辽宁省首次暴发非洲猪瘟，该病在全国迅速传播，造成了重大经济损失。然而，目前没有有效的 ASF 疫苗，ASF 的控制必须依靠早期、高效、准确的诊断和严格的卫生防控。因此开发一种快速、灵敏的检测 ASFV 抗体的方法对于控制 ASFV 的传播至关重要。目前市场上用于检测 ASFV 抗体的试剂盒都为基于蛋白/单抗的 ELISA 试剂盒，都具有耗时长、敏感性差的问题。因此本研究表达了 p72 重组蛋白，并制备单克隆抗体，通过 WB、ELISA、间接免疫荧光试验以及中和试验分析单抗的生物学特性，从而筛选出了特异性强、识别表位高度保守的单抗，并利用其建立了快速、敏感、准确的 CLIA 阻断法，为及时控制 ASFV 传播及流行病学调查提供了可靠的工具。

第二章 ASFV p72 单克隆抗体的制备

p72 是 ASFV 的主要结构蛋白，该蛋白主要参与病毒衣壳的组装，在病毒吸附和入侵易感细胞中起到重要作用。因此为了进一步了解 p72 蛋白，本研究通过对 p72 基因优化，构建 p72-SUMO 重组质粒，利用大肠杆菌表达全长 p72 重组蛋白并对其进行纯化鉴定，纯化后复性的蛋白免疫 BALb/c 小鼠，使用杂交瘤细胞融合法制备了 17 株杂交瘤细胞，并将其注入小鼠腹腔，收集纯化腹水，共获得 17 株 p72 特异性单克隆抗体，这为进一步拓展 p72 表位图谱以及开发新的检测方法提供了材料。

2.1 材料

2.1.1 细胞、质粒及实验动物

骨髓瘤细胞（SP2/0）由本实验室保存，pET-SUMO 载体质粒由本实验室保存，6-8 周龄与 10-12 周龄的 SPF 级 BALb/c 雌鼠均来自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

2.1.2 主要试剂与仪器

PEG-2000、HAT Supplement（50×）培养基、HT Supplement（50×）培养基、考马斯亮蓝 R-250 和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购于 Sigma，Nano Drop 紫外分光光度计、细胞培养箱、ECL Western Blotting Substrate 和酶标仪购于 Thermo Fisher Scientific 公司，小鼠腹水佐剂购于博奥龙有限公司，SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒购于 Southern Biotech 公司，咪唑、尿素和丙烯酰胺购于上海生工生物公司，PCR 仪器购于 Bio-Rad 公司。

2.1.3 主要试剂配制

氨苄抗生素（Amp，配置浓度为 100 mg/mL）：称取 2 g 氨苄抗生素，加入 ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后放于-20℃保存。

卡那抗生素（Kan，配置浓度为 50 mg/mL）：称取 1 g 卡那抗生素，加入 ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后放于-20℃保存。

IPTG 诱导剂：称取 4.77 g IPTG，加入 ddH₂O 定容至 20 mL，搅拌溶解后放于-20℃保存。

2.2 实验方法

2.2.1 目的基因合成

从 GenBank 数据库（GenBank MH766894.1）中检索 p72 基因，在 5'加入酶切位点 BamHI，3'端加入酶切位点 XbaI，并委托上海生工生物有限公司合成。

2.2.2 p72-SUMO 重组质粒的构建

2.2.2.1 双酶切反应

将 p72 基因和 pET-SUMO 载体分别用限制性内切酶 BamHI、XbaI 进行酶切，置于 37℃ 酶切 2 h 后，使用胶回收试剂盒进行回收备用。具体反应体系见表 2-1：

表 2-1 双酶切反应体系

组分	体积
p72 基因/pET-SUMO 载体	2 μ L
限制性内切酶 BamHI	0.5 μ L
限制性内切酶 XbaI	0.5 μ L
Cut Smart Buffer (5 \times)	8 μ L
ddH ₂ O	29 μ L

2.2.2.2 连接转化

将胶回收后的 p72 酶切产物与载体酶切产物进行 16℃ 过夜连接，具体反应体系如表 2-2 所示：

表 2-2 连接反应体系

组分	体积
p72 基因	5 μ L
pET-SUMO 载体	3 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
T4 DNA Ligase Buffer (10 \times)	1 μ L

将 2 μ L 的连接产物加入到 50 μ L 感受态细胞中并放置于冰上孵育 30 min。然后，在 42℃ 中继续反应 60 s。再次放置于冰上继续反应 3 min，随后，加入到 500 μ L 的无抗 LB 培养基振荡孵育 45 min。最后从中吸取 100 μ L，用无菌玻璃棒均匀涂抹在 Amp⁺抗性的 LB 琼脂板上，并在 37℃ 培养箱中倒置，过夜培养。

2.2.2.3 p72-SUMO 重组质粒的提取与双酶切鉴定

从培养好的平板上随机挑取三个单个、颗粒较大、边缘光滑的白色菌落，接种到含有 Amp⁺ 的 LB 培养基中，置于 37℃ 培养 12 h。10,000 g 离心 1 min 收菌，用小提质粒试剂盒提取 p72-SUMO 重组质粒，具体操作参考说明书。对 p72-SUMO 重组质粒进行双酶切鉴定，将酶切后验证正确的菌液进行保菌，具体操作为：甘油与 LB 无抗液体培养基按照 1:1 混合后高压灭菌，取

2 mL 菌液与 2 mL 含有 50%甘油的 LB 培养基混匀，分装后放于-70℃保存备用。

2.2.3 p72 重组蛋白的表达和纯化

将经过验证正确的 p72-SUMO 重组质粒转入感受态细胞 BL21 (DE3) 中，挑取板中单个菌落，接入 Amp⁺ 抗性的 LB 培养基中振荡培养。加入诱导剂 IPTG，16℃振荡培养 20 h。之后，将菌液以 5,000 rpm，离心 10 min。将菌体回收后，重悬在配制好的包涵体缓冲液中（20 mM Tris，500 mM NaCl，10 mM EDTA，1% Triton X-100，pH 8.0），并在冰上超声，离心后，去除上清液，将包涵体重悬于 IB 增溶缓冲液（20 mM Tris，500 mM NaCl，8 M 尿素，pH 8.0）中，并在 4℃下旋转溶解过夜。离心后收集上清液，并加入到 Ni-NTA 柱中进行纯化，纯化后用 SDS-PAGE 分析洗脱蛋白的纯度。对纯化的蛋白进行透析复性。简而言之，将纯化的蛋白装入透析袋中，在复性缓冲液 1（4 M 尿素，200 mM 咪唑，20 mM Tris，250 mM NaCl 缓冲液，0.1% Triton-100，pH 8.0）中 4℃复性 12 小时。然后转移到复性缓冲液 2（2 M 尿素，100 mM 咪唑，20 mM Tris，250 mM NaCl，0.1% Triton-100，pH 8.0）中复性 12 h，再转移到复性缓冲液 3（20 mM Tris，250 mM NaCl，0.1% Triton-100，10%甘油，0.4 M 精氨酸，2 mM 还原型谷胱甘肽，0.2 mM 氧化型谷胱甘肽，pH 8.0）中复性 12 h，复性后的重组蛋白分装放于-20℃保存备用。

2.2.3.1 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹 (Western blot, WB)

在样品中加入蛋白上样缓冲液与之混合，加热 10 min。随后，将制备好的样品加入到 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。考马斯蓝染色液染色 10 min，加入脱色液，对凝胶上的条带进行分析。对于 western blot，将凝胶上的蛋白质样品电转至 PVDF 膜。加入 1:200 稀释的 ASF 阳性血清，4℃ 孵育过夜。加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的山羊抗猪 IgG。加入显色液，使用 Odyssey CLx 成像系统扫描和分析条带。

2.2.4 免疫动物

将 p72 重组蛋白与等比例的弗氏完全/不完全佐剂乳化，并对小鼠（20 μg p72/只）进行免疫，具体免疫程序如表 2-3 所示：

表 2-3 免疫程序

Table 2-3 Immunization program

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

2.2.5 p72 单抗的制备

2.2.5.1 杂交瘤细胞的制备

第4次免疫3 d后, 取脾细胞与SP2/0细胞融合。具体操作为: 将小鼠眼球摘除采取阳性血, 放于4℃过夜分离血清。然后将小鼠脱颈处死后, 无菌取脾并将脾研碎后使用细胞筛过滤。将SP2/0细胞与脾细胞按1:2的细胞比例混匀, 离心后弃上清, 将细胞沉淀轻轻拍散, 缓慢滴入融合剂PEG 1mL, 再缓慢加入无抗DMEM培养基25 mL, 离心后弃去上清。加入含有HAT Supplement DMEM培养基将细胞沉淀重悬, 并加入到铺有饲养层细胞的96孔板中培养。挑取阳性细胞孔, 有限稀释法亚克隆3次, 培养7-10 d后收集细胞上清, 用间接ELISA法筛选阳性细胞孔, 选取单个细胞生长的阳性孔扩大培养并冻存。

2.2.5.2 腹水的制备与纯化

将0.3-0.5 mL腹水佐剂注入12周龄的雌性BALB/c小鼠腹腔, 并于14 d后将约 1.0×10^6 个杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内。于9-10 d后, 腹水收集。采用亲和层析法纯化腹水, 通过SDS-PAGE来分析纯化后单抗的纯度。利用SBA Clonotyping System-HRP试剂盒对单克隆抗体进行亚型鉴定, 具体操作为: 将稀释的单抗加入到已包被p72重组蛋白的ELISA板中, 37℃孵育30 min。加入1:1000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)、IgM、IgA以及 λ 、 κ , 37℃反应30 min。PBST清洗3次, 加入显色液100 μ L, 37℃孵育5 min, 并使用酶标仪测量450 nm的OD值。

2.2.5.3 间接ELISA (iELISA)

将p72重组蛋白用CBS稀释至浓度为0.25 μ g/mL, 4℃过夜孵育。每孔加入稀释的杂交瘤细胞上清液或腹水单抗, 37℃反应30 min。加入1:10000稀释的HRP标记的山羊抗鼠IgG, 37℃反应30 min。加入显色液50 μ L, 37℃反应10 min。加入终止液50 μ L, 并使用酶标仪测量450 nm的OD值。

2.3 结果

2.3.1 p72-SUMO 重组质粒的双酶切鉴定

p72-SUMO重组质粒经双酶切后, 可见一条大小约为2000 bp左右的p72基因条带和一条大小约为3000 bp的条带, 与预期相符, 表明重组质粒构建成功(图2-1)。

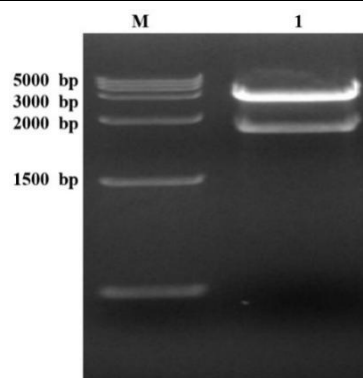


图 2-1 p72-SUMO 重组质粒双酶切鉴定

Fig. 2-1 Identification of p72-SUMO recombinant plasmid by double enzyme digestion

M 为 DL5000 Marker; 1 为 p72-SUMO 重组质粒双酶切产物

M is DL5000 Marker, lane 1 is a double enzyme digestion product of p72-SUMO recombinant plasmid

2.3.2 p72 重组蛋白的表达纯化与鉴定

p72 重组蛋白在大肠杆菌中诱导表达，SDS-PAGE 验证该蛋白的表达形式为包涵体，分子量约为 90 kDa（p72 约为 72 kDa，载体蛋白约为 18 kDa）（图 2-2A），与预期大小一致。表达的重组蛋白经 Ni-NTA 纯化，通过 SDS-PAGE 验证洗脱蛋白的纯度，可见纯化后无其它杂带，纯化效果较好（图 2-2B）。通过 WB 鉴定重组蛋白与 ASF 阳性血清的反应性，结果表明 p72 重组蛋白有良好的反应性（图 2-2C）。纯化复性后的 p72 重组蛋白免疫小鼠，制备了 17 株能稳定分泌 p72 特异性抗体的杂交瘤细胞。

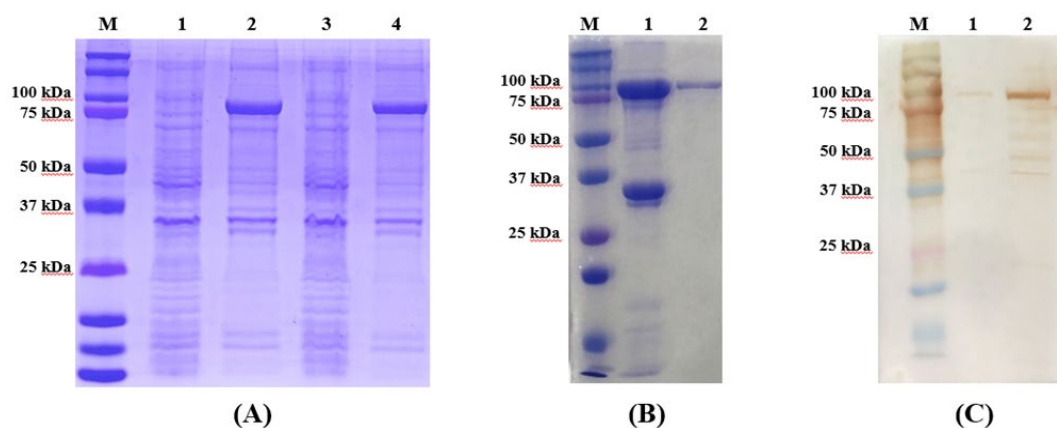


图 2-2 p72 重组蛋白的表达及鉴定

Fig. 2-2 Production and identification of the p72 recombinant protein

A: p72 重组蛋白的表达形式，M 为蛋白 Marker，1 为诱导前的细菌；2 为诱导后的细菌，3 为超声后的细菌上清，4 为超声后的细菌沉淀。B: p72 重组蛋白的纯化鉴定，M 为蛋白 Marker，1 为纯化前的 p72 重组蛋白，2 为纯化后的 p72 重组蛋白。C: p72 重组蛋白与

ASF 阳性血清的反应性，M 为蛋白 Marker，1 为诱导前细菌裂解物，2 为诱导后细菌裂解物

A: Expressed form of p72 recombinant protein in *E. coli*. M is the protein marker, lane 1 contains the bacterial lysate before induction, lane 2 contains the bacterial lysate after induction, lane 3 contains the supernatant after ultrasonic lysis of the bacteria, and lane 4 contains the precipitate

after ultrasonic lysis of the bacteria. B: Purification of the p72 recombinant protein. M is the protein marker, lane 1 contains the cell precipitate before purification, and lane 2 contains the purified p72 recombinant protein. C: Reactivity of p72 recombinant protein with ASF positive serum. M is the protein marker, lane 1 contains the pre-induction bacterial lysate, and lane 2 contains the post-induction bacterial lysate.

2.3.3 mAb-2B8D7 单抗的纯化

mAb-2B8D7 经 Protein G 亲和层析柱纯化后，通过 SDS-PAGE 分析单抗纯度，结果显示了两条目的条带，单克隆抗体经 β -巯基乙醇或 SDS 还原后，破坏了重链和轻链间的二硫键，从而产生了分子量分别约为 50 kDa 的重链和 25 kDa 的轻链，并且由图 2-3 可见纯化后的单抗纯度较高，符合后续实验的要求。

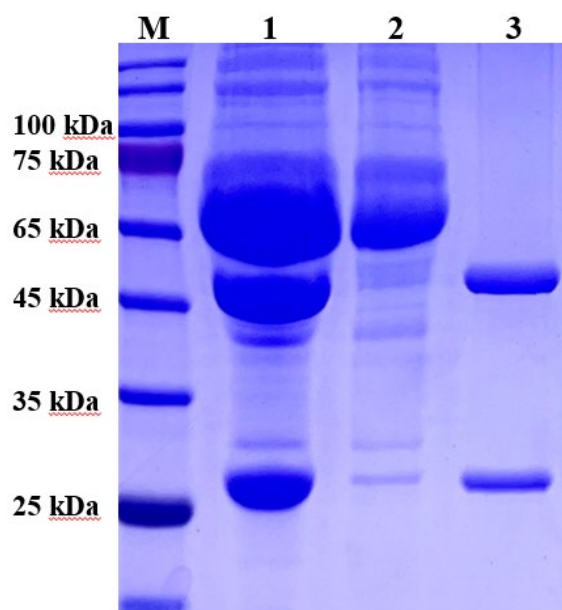


图 2-3 mAb-2B8D7 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-3 SDS-PAGE analysis of purified mAb-2B8D7

M 为蛋白 Marker; 1 为纯化前的 mAb-2B8D7; 2 为流穿液; 3 为纯化后的 mAb-2B8D7

M is protein Marker; lane 1 is mAb-2B8D7 before purification; lane 2 is flow through liquid; lane 3 is purified mAb-2B8D7

2.3.4 17 株单克隆抗体的亚型鉴定

17 株单克隆抗体利用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒进行亚型鉴定，具体结果如表 2-4 所示。

表 2-4 17 株单克隆抗体的亚型鉴定

Table 2-4 Subtype identification of 17 mAbs

名称	H 链类型	L 链类型
4F6D4	IgG1	Kappa
5C9E3	IgG2a	Kappa
4E10C9	IgG1	Kappa
2B8B9	IgG1	Kappa
6B10E8	IgM	Kappa
2B8F7	IgG1	Kappa
2B7B6	IgG1	Kappa
4E10B3	IgG1	Kappa
3D4A9	IgG2a	Kappa
6H2C5	IgG1	Kappa
4E10B2	IgG1	Kappa
4D4C8	IgG1	Kappa
6D6D9	IgG1	Kappa
2C9D6	IgG1	Kappa
5C9D6	IgG1	Kappa
2B8D7	IgG1	Kappa
4F6B8	IgG2b	Kappa

2.4 讨论

ASF 给全球生猪及相关产业造成了巨大损失。目前还没有商业化的 ASF 疫苗 (FRANZONI et al., 2022)。因此快速准确的实验室诊断技术对于非洲猪瘟的防控至关重要。目前, p30、p54、p72 等因其高免疫原性和抗原性, 常被用作血清学诊断靶点。而其中的 p72 约占整个病毒粒子的三分之一 (REVILLA et al., 2018), 是 ASFV 的主要结构成分, 也同样是检测 ASFV 感染后抗体的主要靶点 (CUBILLOS et al., 2013)。因此本研究中选取了 p72 进行制备单克隆抗体。

目前在国内外关于表达全长 p72 重组蛋白的研究都是仅限于利用哺乳动物或昆虫等真核系统表达 (HEIMERMANN et al., 2018; YIN et al., 2022), 从而制备 mAb, 而在本研究中, 通过筛选和优化原核表达载体和 p72 基因序列, 利用大肠杆菌表达系统表达全长的 p72 重组蛋白, 并用其制备 mAb, 其优势在于能够在较短时间内获得大量的表达产物, 而且成本相对低廉。

单克隆抗体是对抗原或表位具有高度特异性的免疫球蛋白, 具有特异性强, 纯度高, 灵敏度高, 易大量生产和成本低等优点, 因此具有广泛的临床和医疗用途, 在兽医诊断和治疗中发

挥着重要作用。将单克隆抗体应用于诊断中可以提高诊断敏感性和特异性，此外，单克隆抗体识别的中和表位能够起到中和病毒的作用。作为中和抗体，中和抗体能够提高攻毒后猪的存活率，且存活率与产生的中和抗体的水平呈正相关 (SILVA et al., 2022)。然而有研究表明，即使存在中和抗体也不能完全中和 ASFV，不能被中和的病毒约占 4%-13% (ZSAK et al., 1993)。这可能与 ASFV 感染后，由非中和抗体导致的 ADE 效应有关 (ESCRIBANO et al., 2013)。总之，筛选和鉴定识别 ASFV 的中和表位的单克隆抗体有助于 ASFV 亚单位疫苗以及诊断方法的开发，并且能够帮助拓展 ASFV 表位图谱，对抗病毒策略的开发至关重要。

第三章 ASFV p72 表位的鉴定及初步应用

ASF 是一种引起猪高度致死性、出血性的病毒性疾病，在中国和其它地方造成严重损失。开发 ASFV 疫苗和诊断技术对于预防和控制非洲猪瘟的传播至关重要。ASFV p72 蛋白具有高度的免疫原性和反应性，是 ASF 疫苗和诊断研究中的优势抗原。本研究共获得 17 株 p72 单克隆抗体 (mAbs)，这些单克隆抗体未表现出显著的中和能力。IFA 和 WB 结果显示，除三株单克隆抗体 (3D4A9、5C9E3、2C9D6) 与 ASFV 反应性较差，其余单克隆抗体均与 ASFV 反应性较好。通过在大肠杆菌中表达的一系列重叠肽进行表位鉴定，结果表明这些单克隆抗体共识别 7 个线性 B 细胞表位 (表位 1-7)。其中表位 1 (²⁴⁹HKPHQSKPIL²⁵⁸)，表位 2 (⁶⁹PVGFYENKV⁷⁷)，表位 5 (¹⁹⁵VNGNSLDEYSS²⁰⁵) 和表位 7 (²²³GYKHLVGQEV²³³) 在之前的研究中从未被报道。序列比对分析表明所鉴定的抗原表位高度保守。为了验证可以用于 p72 抗体检测的单抗，我们用已知的阳性和阴性血清进行初步筛选，最终确定 mAb-2B8D7 具有很好的诊断效果。本研究结果为 ASFV p72 的抗原表位提供了新的见解。

3.1 材料

3.1.1 质粒、细胞

pGEX-4T-1 和 pET-28a 载体质粒均由本实验室保存。ASFV/II/CN/SC/2019 菌株保藏于中国农业科学院兰州兽医研究所 P3 生物安全实验室。根据 Carrascusa 等 (CARRASCOSA et al., 1982) 从健康猪的肺组织中分离的原代猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 储存在液氮中。ASFV 标准阳性血清购自中国兽医药品监察所。

3.1.2 主要实验试剂与仪器

限制性内切酶 BamHI、XhoI 购于北京 NEB 有限公司，四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (TRITC) 标记的山羊抗鼠 IgG 英国 Abcam 公司，SteadyPure Virus DNA / RNA Extraction Kit 和 Pro Taq HS Premix Probe qPCR Kit 购于湖南 ACCURATE BIOLOGY 公司，M16000B 倒置显微镜购于德国 Leica 公司。

3.2 实验方法

3.2.1 间接免疫荧光法 (IFA)

将 PAMs 细胞以 1.0×10^6 个细胞接种于 24 孔细胞板中，用含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养。培养 12 h 后，用 ASFV/II/CN/SC/2019 感染 PAMs 细胞 72 h，感染复数 MOI=0.1。4% 多聚甲醛放于 4℃ 固定 1 h。PBS 洗涤 3 次，用 0.25% Triton X-100 室温透膜 10 min。之后用 5% BSA 37℃ 封闭 2 h，将细胞与 1:10 稀释的杂交瘤上清液混合孵育 1 h。分别加入 1:1000 稀释 TRITC 标记的山羊抗鼠和抗猪 IgG 并于 37℃ 孵育 1 h。使用倒置荧光显微镜 M16000B 观察细胞。

3.2.2 p72 肽片段的表达

为了定位 17 种单克隆抗体识别的表位，基于全长 p72 基因设计了一系列重叠肽（图 3-1）。合成了 81 个基因（S1-S81），所有基因序列见表 A-1—A-3。连接到 pGEX-4T-1 表达载体中，构建重组质粒。经 DNA 测序分析验证后，将重组质粒转化至感受态细胞 BL21（DE3）进行诱导表达，16℃ 培养 20 h，1,0000 rpm 离心，弃上清，菌体沉淀用 PBS 重悬后，加入蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min，进行 SDS-PAGE 和 WB。

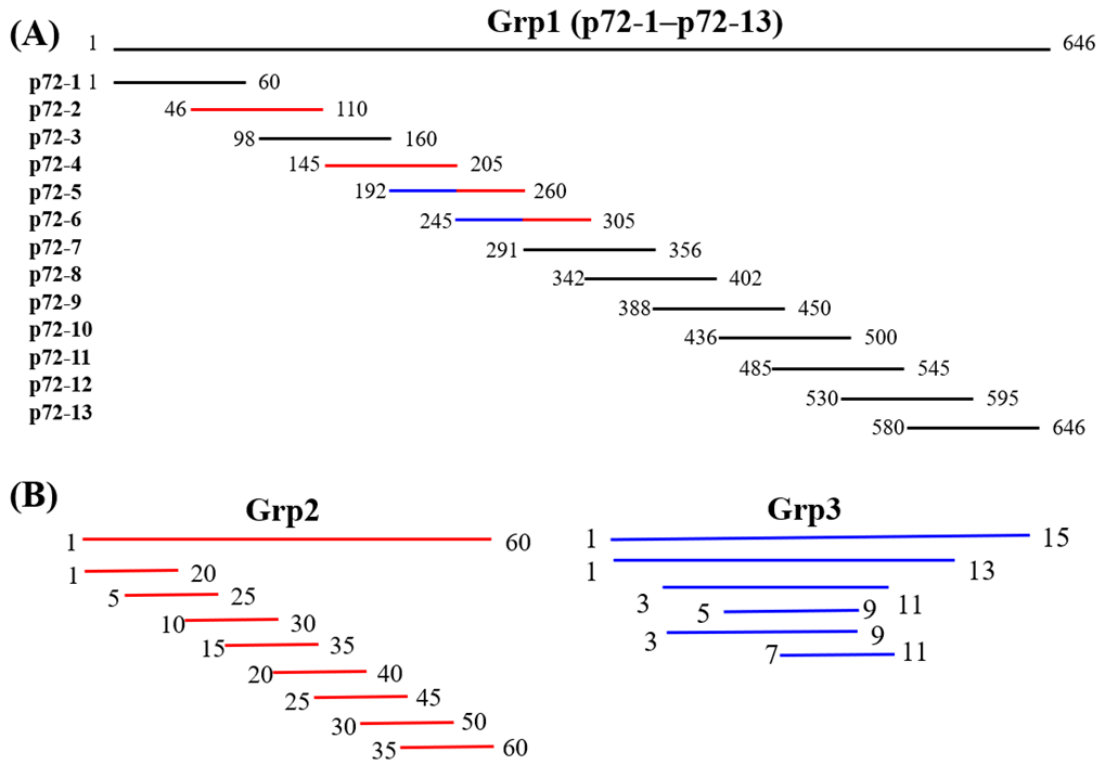


图 3-1 p72 重叠片段示意图

Fig. 3-1 Diagram of overlapping fragments of p72

图 A 中 Grp1 代表 13 个基于全长 p72 截短的重叠肽（p72-1-p72-13）。图 B 中 Grp 2（Grp1 中以红色标出）代表四个短肽（p72-2、p72-4、p72-5、p72-6）的截短方式；Grp3（在 Grp1 中以蓝色标出）代表两个重叠短肽（p72-45, aa 192-205; p72-56, aa 245-260）的截短方式

A: Grp1 comprises 13 overlapping peptides (p72-1 to p72-13) based on full-length p72. B: Grp2 (marked in red in Grp1) comprises the truncation mode of four peptides (p72-2, p72-4, p72-5, and p72-6). Grp3 (marked in the blue in Grp1) comprises the truncation mode of two overlapping peptides (p72-45, amino acids 192 to 205; p72-56, amino acids 245 to 260).

3.2.3 序列比对

为了验证不同 ASFV 基因型中 7 个表位的保守性，使用 Clustal W 对来自 9 种不同基因型的 27 个分离株的代表序列进行比对，以确定这些表位中是否发生突变。

3.2.4 SDS-PAGE 和 WB

方法如第二章 2.2.3.1 所示。

3.2.5 中和试验

将 PAMs 细胞调整至 1×10^6 个/mL 并铺到 24 孔培养板中, 培养基为含有 15% FBS 的 RPMI-1640, 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 12 h。将纯化后的单抗稀释至 $5 \mu\text{g/mL}$ 与 ASFV CN/SC/2019 (200TCID_{50}) 混合, 并在 4°C 下孵育过夜。将病毒和单抗的混合物接种到含有 PAMs 细胞中。孵育 1 h 后, 弃去混合物, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入含 5% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 培养 72 h。将其反复冻融 3 次, 使用病毒基因组提取试剂盒提取各孔的 ASFV 基因组, 并进行 qPCR 扩增。

使用灭活的 ASFV CN/SC/2019 作为模板, 使用上下游引物 p72-F (5'-GGAATTCATATGGCATCAGGAGGAGC-3') 和 p72-R (5'-CCGCTCGAGTTCTTAAACCCCGCAAAT-3') 进行 PCR 扩增 (ZHANG et al., 2021a)。PCR 扩增产物和 pET-28a 载体经 BamHI 和 XhoI 酶双酶切后, 构建 p72-pET28a 重组质粒。选取重组质粒浓度梯度为 10^1 - 10^8 Copies/ μL , 以此为模板进行 qPCR 扩增, 使用线性回归分析重组质粒浓度的对数值和 Ct 值, 从而建立标准曲线, 之后根据 Ct 值及建立的标准曲线计算出各样本中 B646L 基因的拷贝数。病毒中和率 (%) 计算如下:

$$\text{中和率 (\%)} = 100\% - \frac{\text{B646L 基因的拷贝数 (mAb - ASFV)}}{\text{B646L 基因的拷贝数 (ASFV)}} \%$$

3.2.6 竞争 ELISA (cELISA)

为了验证 17 种单克隆抗体在诊断中可行性, 用 cELISA 进行了初步筛选。简而言之, 在 96 孔板中包被 p72 重组蛋白, 用 CBS 稀释至最终浓度为 0.125 - $8 \mu\text{g/mL}$, 4°C 包被过夜。用 5% 脱脂奶粉进行封闭, 37°C 封闭 2 h。加入 1:5-1:640 稀释的 ASF 标准阳性和阴性血清, 37°C 下反应 1 h。PBST 洗 3 次, 加入 1:1000 - 128000 稀释的单克隆抗体, 37°C 反应 30 min。加入 1:10000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG, 37°C 反应 30 min。加入 $50 \mu\text{L}$ TMB 底物溶液, 37°C 孵育 10-15 min, 再加入 $50 \mu\text{L}$ 2M H_2SO_4 终止反应, 并使用酶标仪测量 450nm 下的 OD 值。通过使用最佳抗原包被浓度、单克隆抗体稀释度和血清稀释度, 计算阴性血清与阳性血清的比值 (N/P)。N/P 比值越大表明 ASFV 感染血清能够更好地阻断单克隆抗体与 p72 蛋白的结合。

3.3 结果

3.3.1 17 株单克隆抗体的反应性

IFA 结果显示了所有 17 株单克隆抗体与 ASFV 的反应性。其中, 3 株单克隆抗体 (3D4A9, 5C9E3 和 2C9D6) 与 ASFV 的反应性较差 (图 3-2)。我们通过 WB 进一步验证了这 17 株单克隆抗体与 ASFV 感染 PAMs 细胞的反应性。结果显示, 4 株单克隆抗体 (2B8B9, 5C9D6, 4E10C9 和 6D6D9) 与 ASFV 高度反应, 而 3 株单克隆抗体 (3D4A9, 5C9E3 和 2C9D6) 与 ASFV

不反应（图 3-3）。

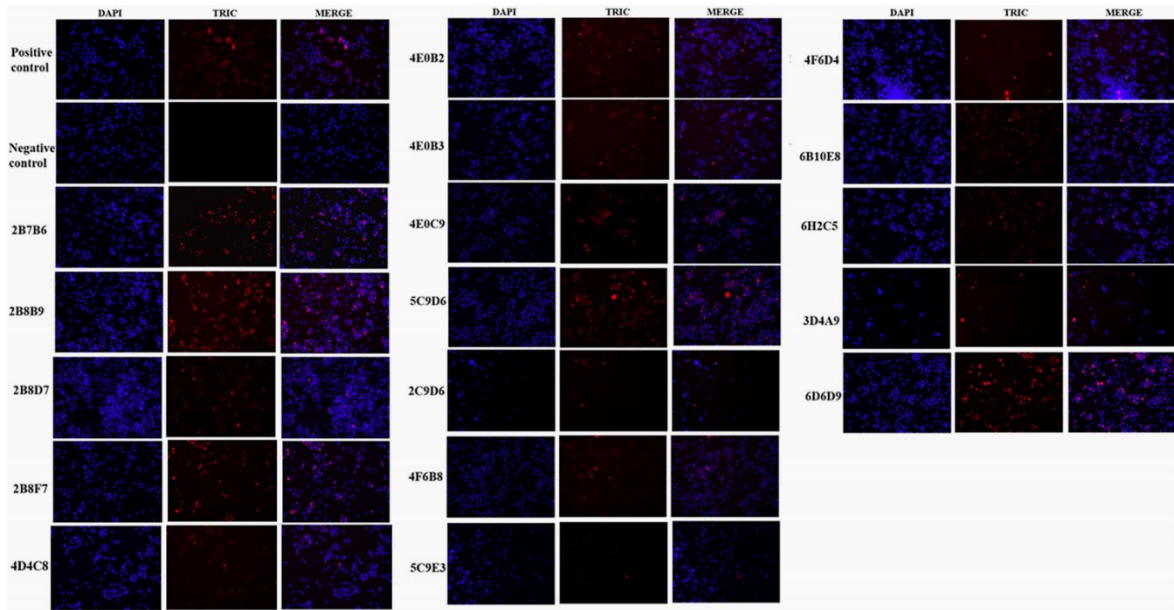


图 3-2 间接免疫荧光试验 (IFA) 中 17 种单克隆抗体的反应性

Fig. 3-2 Reactivity of 17 mAbs in the indirect immunofluorescence assay (IFA)

阳性对照为 ASF 阳性血清，未感染的 PAMs 作为阴性对照

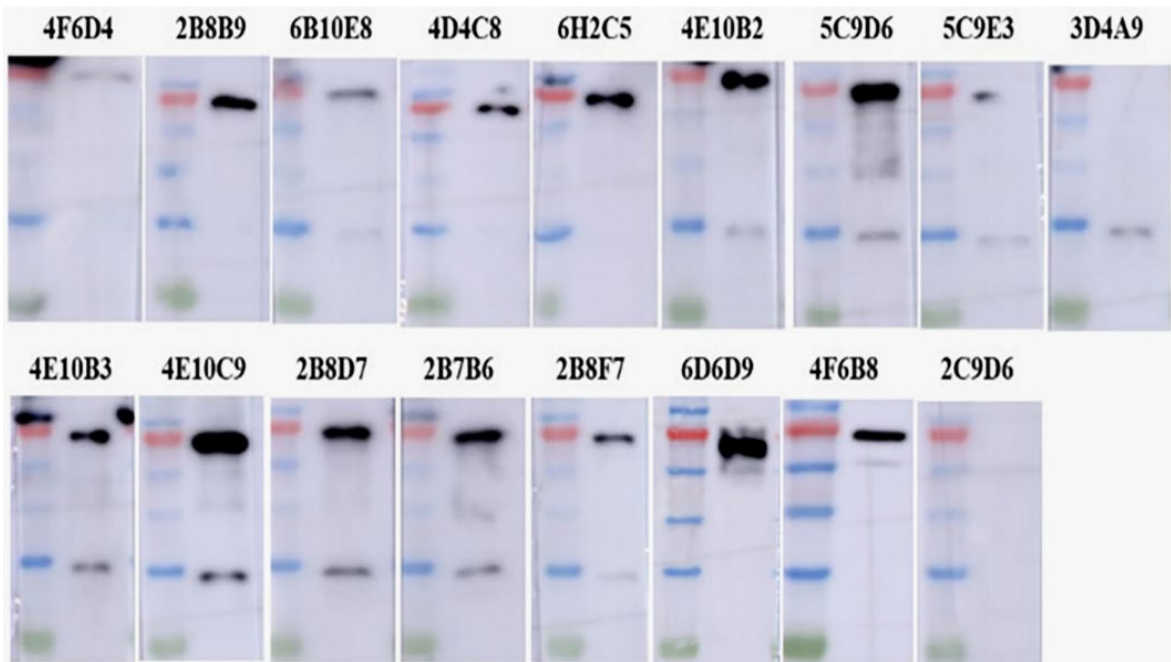


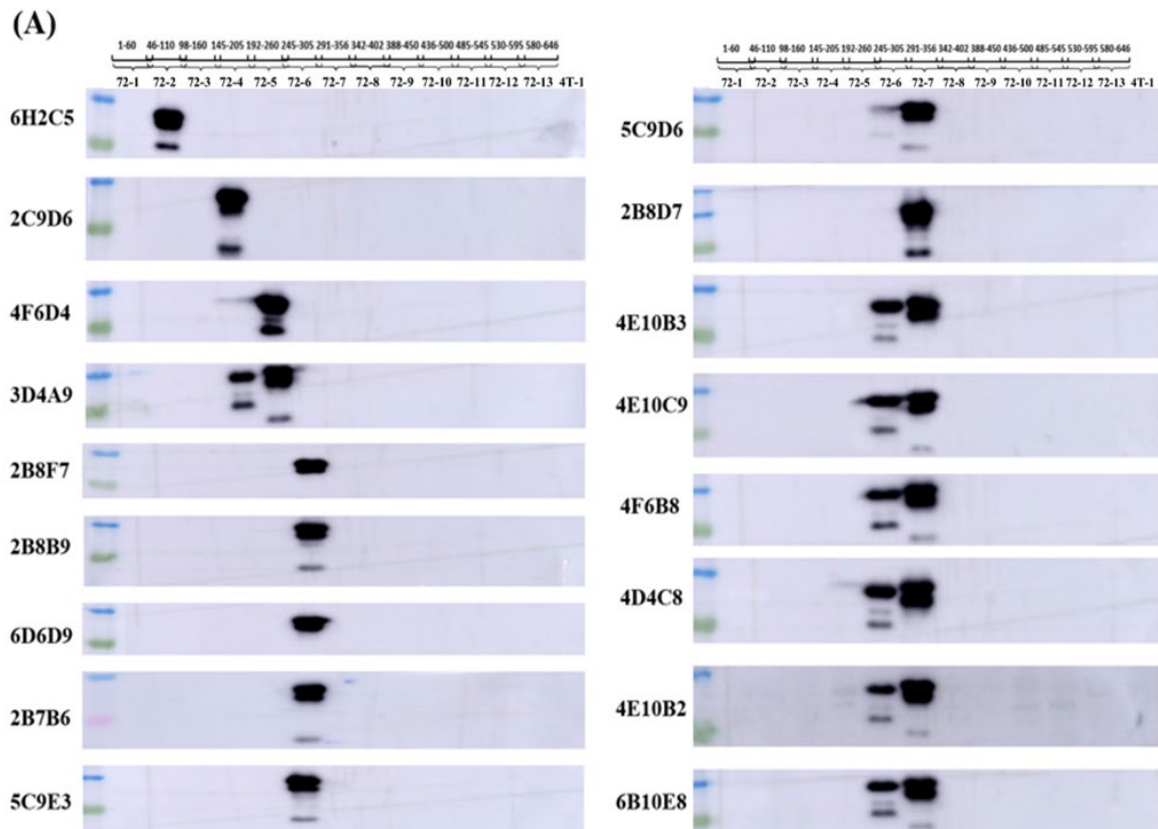
图 3-3 WB 初步鉴定 17 株单克隆抗体与 ASFV 的反应性

Fig. 3-3 Reactivity of 17 mAbs against ASFV was preliminarily identified by WB

3.3.2 表位的表达与鉴定

为了鉴定 17 株单克隆抗体识别的表位，使用大肠杆菌表达系统表达了一系列跨越 p72 全长 (1-646 aa) 的 13 个重叠肽片段 (p72-1、p72-2、p72-3、p72-4、p72-5、p72-6、p72-7、p72-8、

p72-9、p72-10、p72-11、p72-12 和 p72-13），并通过 WB 进行分析。结果表明识别的表位分别位于肽片段 p72-2 (6H2C5)、p72-4 (2C9D6)、p72-5 (4F6D4)、p72-45 (3D4A9)、p72-6 (2B8F7、2B8B9、6D6D9、2B7B6、5C9E3、5C9D6 和 2B8D7) 以及 p72-56 (4E10B3、4E10C9、4F6B8、4D4C8、4E10B2 和 6B10E8) (图 3-4A)。为了进一步确定这些单克隆抗体的定位，我们表达了一系列基于 p72-2 (分九段)、p72-4 (分九段)、p72-5 (分九段)、p72-45 (分五段)、p72-6 (分九段) 和 p72-56 (分五段) 的重叠肽，分别与单克隆抗体反应。结果显示 3D4A9 的识别表位为¹⁹⁵VNGNSLDEYSS²⁰⁵，2B8F7 和 2B8B9 识别的表位为²⁷¹TNPKFLSQHF²⁸⁰，6D6D9、2B7B6、5C9E3、5C9D6 和 2B8D7 识别的表位为²⁸¹PENSHNIQTA²⁹⁰，4E10B3、4E10C9、4F6B8、4D4C8、4E10B2 和 6B10E8 识别的表位为²⁴⁹HKPHQSKPIL²⁵⁸ (图 3-4B)。其余三株单抗 (6H2C5、2C9D6、4F6D4) 识别的表位氨基酸序列较长，因此我们通过从 N-或 C-末端连续缩短两个或三个氨基酸。WB 结果表明，6H2C5 识别的表位为⁶⁹PVGFYENKV⁷⁷、2C9D6 识别的表位为¹⁵⁸VDPFGRPIV¹⁶⁶ 和 4F6D4 识别的表位为²²³GYKHLVGQEV²³³ (图 3-4B 和 3-4C)。此外，通过使用 PyMOL 软件将这 17 株单克隆抗体识别的表位显示在 ASFV p72 蛋白的结构 (图 3-5)。



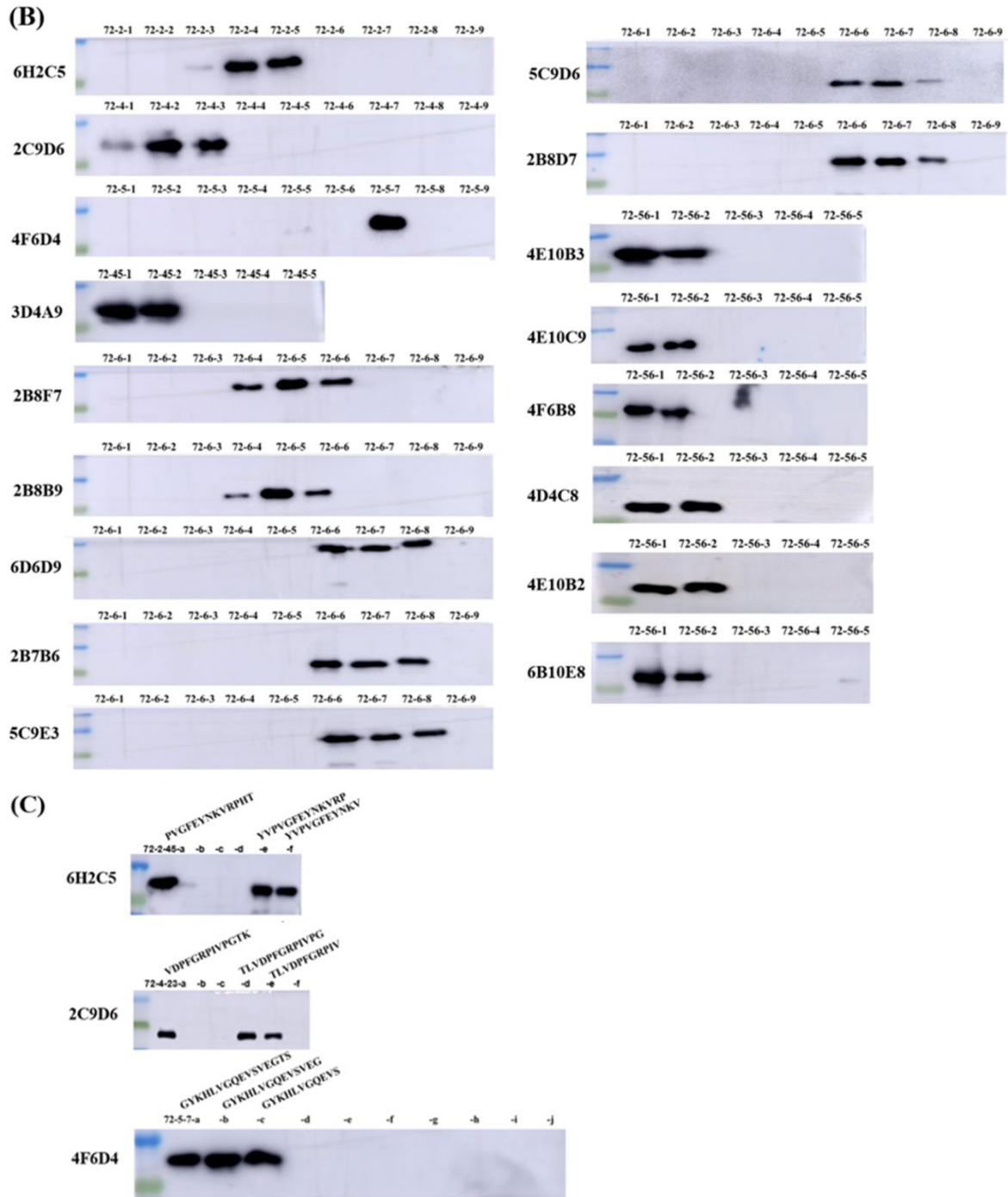


图 3-4 17 株单克隆抗体识别表位的绘制

Fig. 3-4 Chromatograms of 17 mAbs recognition epitopes

图 A 为基于全长 p72 截短的 13 个重叠肽 (p72-1-p72-13) 与 17 株单克隆抗体的反应性。图 B 为基于 6 个肽片段 (p72-2、p72-4、p72-5、p72-45、p72-6 和 p72-56, 具有图 5A 所示的反应性) 截短的重叠肽与 17 株单克隆抗体的反应性。图 C 为了进一步确定 3 种单克隆抗体 (6H2C5, 2C9D6 和 4F6D4) 识别的表位, 肽片段 (72-2-45, 72-4-23 和 72-5-7) 的 N-或 C-末端依次减去 2 或 3 个氨基酸, 并分别与这 3 种单克隆抗体反应

A: The reactivity of 13 overlapping peptides (p72-1 – p72-13) truncated based on full-length p72 with 17 mAbs. B: The reactivity of truncated overlapping peptides based on six peptide fragments (p72-2, p72-4, p72-5, p72-45, p72-6 and p72-56, which have reactivities identified in Figure 5A) with 17 mAbs. C: To further define the epitopes identified by the 3 mAbs (6H2C5, 2C9D6, 4F6D4), the N- or C-terminus of the peptide fragments (72-2-45, 72-4-23, 72-5-7) were sequentially subtracted by 2 or 3 amino acids and reacted with these 3 mAbs.

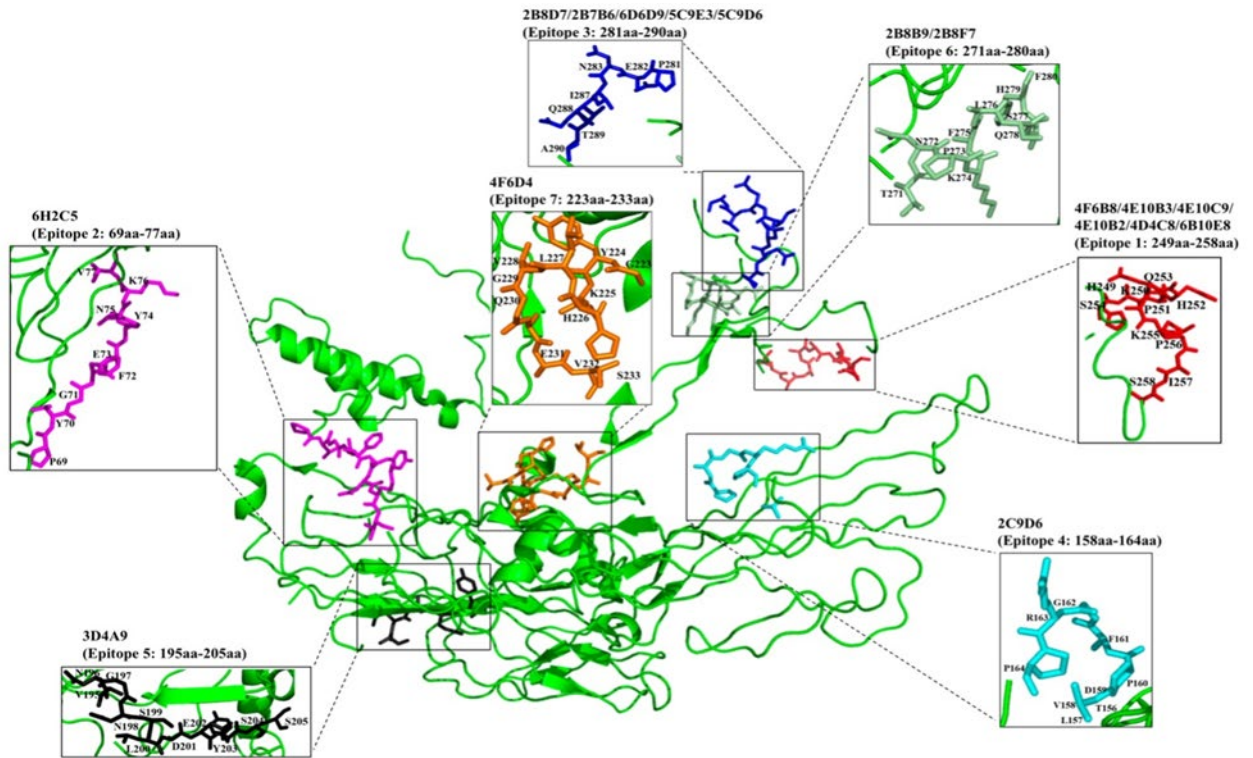


图 3-5 17 株单克隆抗体识别表位在 ASFV p72 蛋白结构中的定位

Fig. 3-5 Localization of epitopes recognized by 17 mAbs in the structure of ASFV p72 protein

3.3.3 保守性分析

来自 9 种基因型的 27 个 ASFV 分离株的序列比对显示，本研究获得的 17 株单克隆抗体识别的 7 个表位高度保守（图 3-6）。

Genotype	GenBank	4E10B3 (Epitope 1)	6H2C5 (Epitope 2)	6D6D9 (Epitope 3)	2C9D6 (Epitope 4)	3D4A9 (Epitope 5)	2B8F7 (Epitope 6)	4F6D4 (Epitope 7)
I	U18466.2	HKPHQSRPIL	PVGFEYKNV	FENSHNIQTA	VDFPGRPIV	VNGNSLDEYSS	TNPKFLSQHF	GYKHLVQGQEVs
	QZK26783.1
	NC 044956.1
	NC 044955.1
	NC 044947.1
II	NC 044941.1
	MZ945536.1
	KM262845.1
	AM712240.1
	MW856069.1
III	QI358136.1
	QIE06872.1
	QIE07035.1
	AKP99042.1
	QDL68113.1
IV	AYW34053.1
	QSH48654.1
	NC 044950.1
	AY261366.1
	AY261364.1
V	AY261361.1
	MH025920.1
	RM111295.1
	MT956648.1
	MW856067.1
X	NC 044944.1
	MN630494.1

图 3-6 17 株单克隆抗体识别的表位与不同 ASFV 基因型分离株序列对比

Fig. 3-6 Sequence comparison of phenotypes identified using the 17 mAbs with different ASFV genotypic isolates

3.3.4 中和试验

标准曲线线性方程: $y = -2.9401x + 34.956$ ($R = 0.9923$) (图 3-7A)。将识别七种表位的七种单克隆抗体(分为四组)与 ASFV (200 TCID₅₀) 共同孵育, 并接种到 PAMs 中。根据 Ct 值及建立的标准曲线计算出各样本中 B646L 基因的拷贝数, 每组重复 3 次, 数据用平均值±标准差表示, 组间差异的显著性用 GraphPad Prism 软件计算 (ZHANG et al., 2021a), $P > 0.05$ 表示无差异 (NS)。结果显示 ASFV-mAbs 与 ASFV 阴性对照之间的 p72 基因的拷贝数无差异 ($P > 0.05$), 说明本研究获得的单克隆抗体对 ASFV 病毒没有显著的中和能力 (图 3-7B)。

图 3-7 7 株单克隆抗体对 ASFV 感染 PAMs 细胞的中和活性

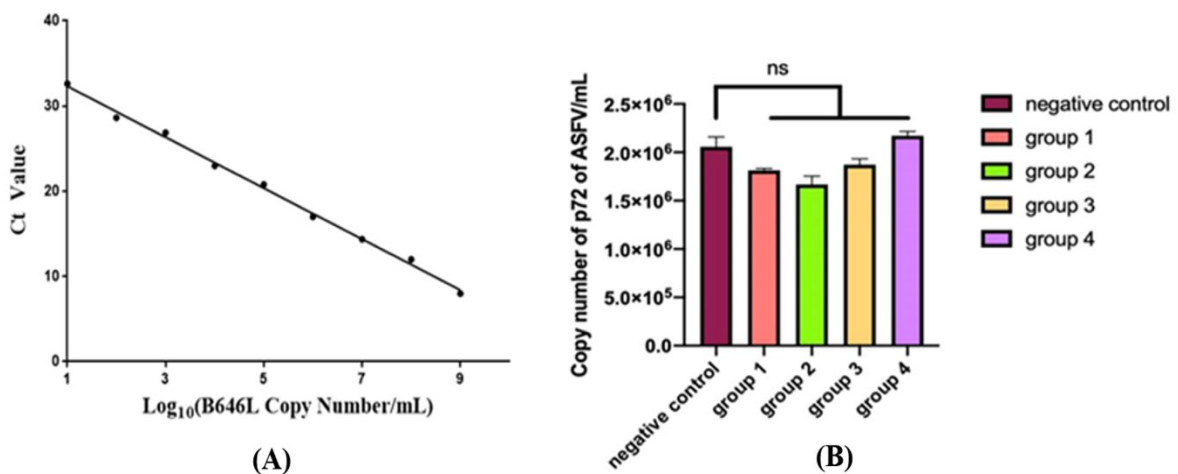


Fig. 3-7 Neutralizing activity of 7 mAbs against ASFV-infected PAMs cells

图 A 为质粒浓度对数值与 Ct 值线性回归。图 B 为组 1-4 中 B646L 基因的拷贝数。组 1 为 mAbs 6D6D9 (识别表位 3) + 2B8F7 (识别表位 6) 和 ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀) 的混合液。组 2 为 mAbs 4F6D4 (识别表位 4) + 2C9D6 (识别表位 7) 和 ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀) 的混合液。组 3 为 mAbs 4E10B3 (识别表位 1) + 6H2C5 (识别表位 2) 和 ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀) 的混合液。组 4 为 mAb 3D4A9 (识别表位 5) 和 ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀) 的混合液。

A: Linear regression between the logarithmic value of plasmid concentration and Ct. B: The number of copies of B646L gene was measured in group 1-4. Group 1 is the mixture of mAbs 6D6D9 (identify epitope 3) + 2B8F7 (identify epitope 6) and ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀). Group 2 is the mixture of mAbs 4F6D4 (identify epitope 4) + 2C9D6 (identify epitope 7) and ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀). Group 3 is the mixture of mAbs 4E10B3 (identify epitope 1) + 6H2C5 (identify epitope 2) and ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀). Group 4 is the mixture of mAb 3D4A9 (identify epitope 5) and ASFV CN/SC/2019 (200 TCID₅₀).

3.3.5 单克隆抗体的初步应用

为确定 17 株单克隆抗体是否可用于诊断, 在抗原包被浓度为 0.25 μg/mL、杂交瘤细胞上清液稀释为 1:5、血清稀释为 1:10 的条件下检测标准阴阳性血清, 根据其 N/P 比值进行初步筛选 (图 3-8A), 实验结果表明只有四种单克隆抗体 (2B8D7、2B8F7、2B7B6 和 5C9D6) 的 N/P 值 > 7。为了进一步优化反应条件, 我们对最佳包被抗原浓度、血清稀释度和四种单克隆抗体的最佳稀释度进行逐步优化 (图 3-8B、C 和 D)。在最佳抗原包被浓度 1 μg/mL, 最佳血清稀释度

为 1:5，单抗浓度为 0.6 μg/mL，单抗 2B8D7 的 N/P 值最高（N/P 为 8.5）。因此选择 mAb-2B8D7 验证诊断的可行性。在上述最佳条件下，检测背景清楚的 6 份阳性血清和 1 份阴性血清。使用以下公式计算每份样品阻断率：

$$\text{抑制百分比 (PI)} = [1 - (\text{待检样本 OD 450} / \text{标准阴性 OD450})] \times 100\%$$

结果显示：6 份阳性血清的 PI 值分别为 93.56%、95.13%、92.61%、91.25%、90.15%、88.63%，阴性血清的 PI 值为 9.34%。初步表明，mAb-2B8D7 能够区分阴性血清和阳性血清。

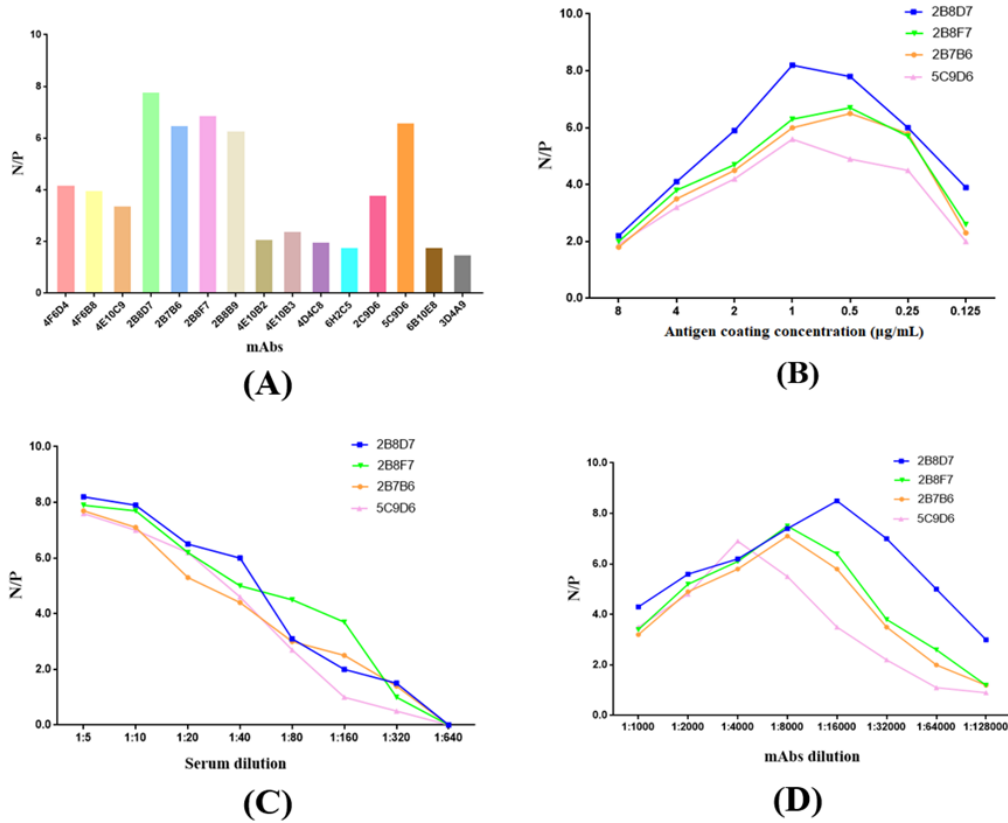


图 3-8 用于 ASFV 诊断的单克隆抗体筛选

Fig. 3-8 Screening of mAbs for ASFV diagnosis

图 A 为在抗原包被浓度 0.25 μg/mL、杂交瘤细胞上清液稀释液 1:5、血清稀释度 1:10 的相同条件下，根据 N/P 比值对 17 株单克隆抗体进行初步筛选。图 B 为所选四种单克隆抗体在不同包被浓度下的 N/P 值。图 C 为在最佳包被浓度条件下（2B8D7 和 2B8F7 为 1 μg/mL，2B7B6 和 5C9D6 为 0.5 μg/mL），四种单克隆抗体在不同血清稀释度下的 N/P 值。图 D 为在抗原最佳包被浓度（2B8D7 和 2B8F7 为 1 μg/mL，2B7B6 和 5C9D6 为 0.5 μg/mL）和血清最佳稀释度（1:5）条件下，4 种单克隆抗体在不同稀释度下的 N/P 值。

A: The 17 mAbs were preliminarily selected based on their N/P ratios in the same conditions of antigen coating concentration of 0.25 μg/mL, hybridoma cell supernatant dilution of 1:5, and serum dilution of 1:10. B: N/P ratios of the four selected mAbs at different coating concentrations. C: N/P ratios of the four mAbs at different dilutions of sera in the condition of optimum coating concentrations (1 μg/mL of 2B8D7 and 2B8F7, 0.5 μg/mL of 2B7B6 and 5C9D6). D: N/P ratios of the four mAbs at different dilutions in the condition of optimum coating concentrations of antigens (1 μg/mL of 2B8D7 and 2B8F7, 0.5 μg/mL of 2B7B6 and 5C9D6) and optimum serum dilution (1:5).

3.4 讨论

ASFV 在全球已有 100 多年的历史 (GAUDREAU et al., 2020)。然而，目前仍没有商业化的

疫苗。提高生物安全水平仍然是预防和控制 ASF 的主要手段 (DANZETTA et al., 2020)。p72 具有良好的反应性和免疫原性, 而且它是受感染猪中最常检测的抗体之一 (LI et al., 2022; LIU et al., 2019), 以及亚单位疫苗的主要靶标之一 (CADENAS-FERNÁNDEZ et al., 2020; LOKHANDWALA et al., 2016; LOPERA-MADRID et al., 2017)。鉴定 p72 蛋白的表位将有助于开发 ASF 亚单位疫苗和血清学诊断, 并可拓展当前对抗原结构和病毒-抗体相互作用的理解。

为了获得更全面的单克隆抗体和绘制 p72 的表位图谱, 本研究采用原核系统表达全长 p72 蛋白, 对小鼠进行免疫。使用获得的 17 个单克隆抗体鉴定得到了 7 个线性 B 细胞表位 (表位 1-7)。mAb 2C9D6 识别的表位 4 ($^{158}\text{VDPFGRPIV}^{166}$)、mAbs 2B8F7 和 2B8B9 识别的表位 6 ($^{271}\text{TNPFLSQHF}^{280}$)、mAbs 6D6D9、2B7B6、5C9E3、5C9D6 和 2B8D7 识别的表位 3 ($^{281}\text{PENSJNIQTA}^{290}$), 这三个表位与 Heimerman 等 (HEIMERMAN et al., 2018) 的研究结果相似 ($^{156}\text{TLVDPFGRPI}^{165}$ 、 $^{265}\text{QRTCSHTNPFLSQHF}^{280}$ 、和 $^{280}\text{FPENSJNIQTAGKQD}^{294}$), mAb 6H2C5 识别的表位 2 ($^{69}\text{PVGFEYENKV}^{77}$)、mAb 4F6D4 识别的表位 7 ($^{223}\text{GYKHLVGQEV}^{233}$)、mAb 3D4A9 识别的表位 5 ($^{195}\text{VNGNSLDEYSS}^{205}$) 以及 mAbs 4E10B3、4E10C9、4F6B8、4D4C8、4E10B2 和 6B10E8 识别的表位 1 ($^{249}\text{HKPHQSKPIL}^{258}$), 这四个表位在以前的研究中还从未报道过。

中和试验表明这七类单克隆抗体未显示出显著的中和能力。此外, 在 Yin 等 (2022) 的研究中, 识别四种线性表位的四种单克隆抗体也没有中和能力 (YIN et al., 2022)。但是, 在 Borca 等 (BORCA et al., 1994) 的研究中, 识别 p72 上构象表位的 mAb 135D4 具有部分中和能力。此外, 在 Wang 等 (WANG et al., 2021d) 研究中发现 p72 顶体冠部的暴露区 1 (ER1) 和 ER2 朝向衣壳外部, 这可能有助于形成构象表位; 同一亚单位内 ER3 和 ER4 的 β -链构成一个四链 β -片, 形成 p72 顶体的头部, 这可能是另一个构象表位, 这四个 ER 区可能存在中和表位 (WANG et al., 2021d)。而本研究中鉴定的 7 个表位均为线性表位, 可能是因为我们用于免疫小鼠的 p72 蛋白是非天然重折叠结构蛋白。

17 株单克隆抗体识别的表位在 ASFV 不同基因型中高度保守。因此, 我们初步评估了这些单克隆抗体在诊断中的应用。结果显示, mAb-2B8D7 的 N/P 值最高, 能特异性区分阳性血清和阴性血清, 说明该单克隆抗体在诊断方法中的潜力。mAb-2B8D7 可进一步用于磁微粒化学发光免疫分析的开发, 实现未来的自动化、高通量、快速检测 (FENG et al., 2014; FU et al., 2018; ZHANG and QI, 2011)。

综上所述, 本研究制备了 17 株特异性单克隆抗体, 但是这些单克隆抗体并无显著的中和能力。共鉴定了 7 个线性 B 细胞表位 (表位 1-7), 其中四个线性表位 (表位 1、2、5 和 7) 是鉴定的新表位。这些表位在 9 种 ASFV 基因型中均高度保守。此外, 还筛选了识别表位 3 的 mAb-2B8D7 (HEIMERMAN et al., 2018), 并证明了其在 cELISA 中的潜在价值。这些结果为进一步研究 p72 表位和磁微粒化学发光免疫分析提供了坚实的基础。

第四章 针对 ASFV p72 单克隆抗体化学发光法的建立

非洲猪瘟 (ASF) 是由一种高传染和致死性病毒性疾病, 给全球的生猪及其相关产业造成了巨大的经济损失。由于目前尚无商品化的疫苗, 因此快速、准确、灵敏的实验室检测技术对于 ASF 的防控至关重要。但是由于近年来 ASFV 毒株毒力减弱, 针对核酸或蛋白质的诊断不易检测 ASFV 感染, 因此特异性抗体检测对于 ASFV 的诊断至关重要。在本研究中我们开发了一种检测 ASFV p72 抗体的单抗阻断 CLIA 法。并通过检测背景清楚的阴阳性血清确定了该方法的 Cut-off 值为 40%, 诊断敏感性 (Dsn) 为 100%, 诊断特异性 (Dsp) 为 99.5%。在灵敏度评价中, 该方法比商品化 ELISA 试剂盒灵敏度更高。同时, 使用 p72 CLIA 与商品化 ELISA 试剂盒检测感染后的猪血清及临床阴性猪血清, 结果显示该方法比商品化试剂盒准确率更高。

4.1 材料

4.1.1 实验试剂及仪器

化学发光板购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 血清稀释液购于济南百迪泰公司, 碳酸盐缓冲液购于北京索莱宝公司, 化学发光液购于北京科跃中楷生物技术有限公司, 脱脂奶粉购于美国 BD-Pharmingen 公司, 非洲猪瘟阻断试剂盒购于青岛立行见远生物科技有限公司。化学发光仪和细胞恒温培养箱购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

4.1.2 血清样本

标准阳性血清: 购于中国兽医药品监察所。

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

已知背景清楚的血清: 来自本实验室 2018 年从中国两个养猪场 (甘肃天水秦安和庄浪) 采集了 432 份猪血清, 由于 2018 年之前中国没有发生过 ASF 疫情暴发, 这些血清被认为是 ASF 阴性猪血清, 并用于确定 p72-CLIA 的 Cut-off 值和诊断特异性。68 份阳性血清来自感染的猪, 这些血清样本用于确定 Cut-off 值、诊断敏感性。40 份血清来自田间感染后的猪血清; 66 份血清来自临床阴性的猪血清, 用于比较 p72-CLIA 与商品化阻断试剂盒的符合率。

4.2 实验方法

4.2.1 p72-CLIA

4.2.1.1 p72-CLIA 检测条件的优化

利用棋盘滴定法优化抗原包被浓度、血清稀释度以及酶标单抗浓度。简而言之, 在 96 孔化学发光板中包被 p72 重组蛋白, 用 CBS 稀释至最终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。用 3% BSA 进行封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。加入 1:5、1:10、1:20、1:40 稀释的 ASF 标准阴性血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。加入 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释的酶标单抗 2B8D7-HRP,

37℃反应 30 min。PBST 洗 3 次后，加入化学发光液，37℃反应 5 min，并使用化学发光仪检测化学发光值。

4.2.1.2 p72-CLIA 两步反应时间的优化

使用最佳包被抗原浓度、血清稀释度以及单抗稀释度，进行两步反应时间优化。简而言之，在 96 孔化学发光板中包被 p72 重组蛋白，用 CBS 稀释至最终浓度为 1 μg/mL，放于 4℃包被过夜。加入 1:5 稀释的 ASF 标准阴阳性血清，每板三个重复孔，37℃反应 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、1 h。PBST 洗 3 次，加入 1:1000 稀释的酶标单抗 2B8D7-HRP，37℃反应 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、1 h。PBST 洗 3 次后，加入化学发光液，37℃反应 5 min，并使用化学发光仪测量发光值。

4.2.2 p72-CLIA 检测血清样本

将 p72 重组蛋白用 CBS 稀释为终浓度 1 μg/mL，4℃过夜。用 3% BSA 进行封闭，37℃封闭 2 h，拍干后抽真空，放于 4℃保存备用。使用上述优化的最佳检测条件检测 ASF 阴性血清（432 份）和 ASF 阳性血清（68 份）。具体操作为：取出包被好 p72 抗原的化学发光板，加入在 U 型稀释板按 1:5 稀释的待检血清和标准阴阳性血清，37℃反应 20 min。加入 1:1000 稀释的酶标单抗 2B8D7-HRP，37℃孵育 20 min。PBST 洗 3 次后，加化学发光液，37℃反应 5 min，并使用化学发光仪测量发光值。

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

通过检测上述背景清楚的 ASF 阳性和阴性血清，使用公式计算阻断率：

阻断率 (PI) = [1 - (测试样品 CLIA / 标准阴性平均 CLIA 值)] × 100%。使用 MedCalc 软件作 (ROC) 曲线分析，来确定 Cut-off 值、Dsp 和 Dsn。为确保检测的有效性，需满足以下条件：

标准阴性血清的化学发光值应 ≥ 10,000,000

标准阳性血清的阻断率 (PI) ≥ 95%

4.2.4 p72-CLIA 与商品化试剂盒检测性能对比

使用 p72-CLIA 和商品化阻断试剂盒分别检测感染后猪血清和临床健康的猪血清，比较这两种检测方法的准确性和符合率。

4.2.5 p72-CLIA 灵敏度、重复性、交叉反应性实验

灵敏度：将 ASFV 标准阳性血清按 1:2 - 1:4096 连续 2 倍稀释，采用 p72-CLIA 法和商品化阻断试剂盒同时检测 PI 值。PI 值超过 Cut-off 值时血清的最高稀释度为检测的灵敏度。

重复性：为了计算批次内和批次间的重复性性能，使用相同和不同批次包被的板在不同的时间里对六份具有不同 PI 值的血清样品进行三个重复进行评估。根据化学发光值计算变异系数 (CV)，计算公式如下：。

$$CV = \left(\frac{\text{标准差}}{\text{平均化学发光值}} \right) \times 100\%$$

交叉反应性：开发的 p72-CLIA 对七种针对其他猪病毒（PCV2、PPV、FMDV、PRRSV、PDCOV、CSFV、PEDV）的血清进行检测，以分析其特异性。

4.3 结果

4.3.1 p72-CLIA 的最佳检测条件

根据棋盘滴定法结果以及信噪比，确定最佳反应条件为：最佳抗原包被浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ ，最佳血清稀释度为 1:5，最佳酶标单抗浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ （图 4-1），最佳反应时间为 20 min+20 min（图 4-2）。在这些最佳条件下，标准阳性血清的化学发光值为 362850，标准阴性血清发光值为 382200000，阻断率为 98.55%。

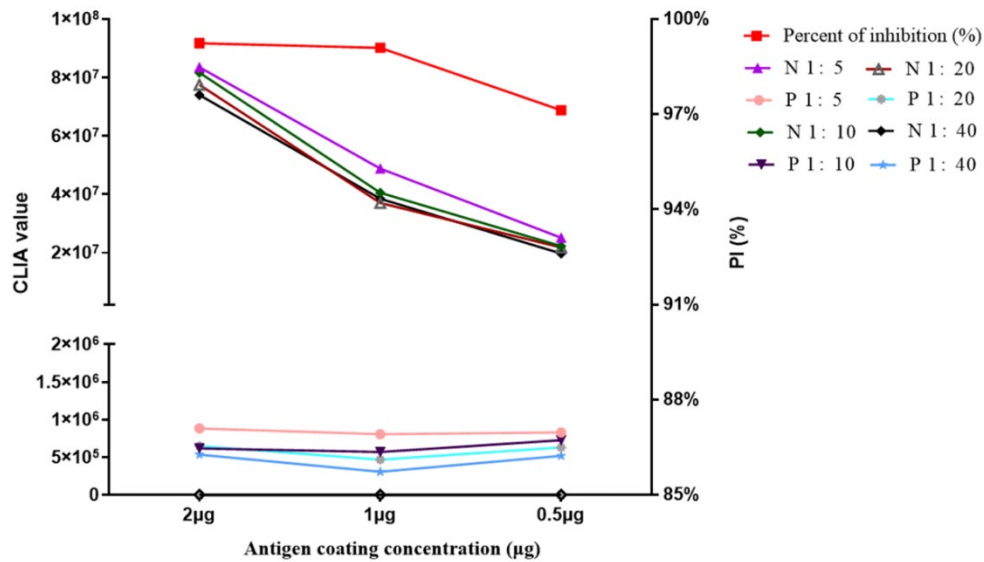


图 4-1 棋盘滴定法优化抗原包被浓度和血清稀释度

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

N 为阴性血清样本，P 为阳性血清样本

N represents a negative serum sample, P represents a positive serum sample

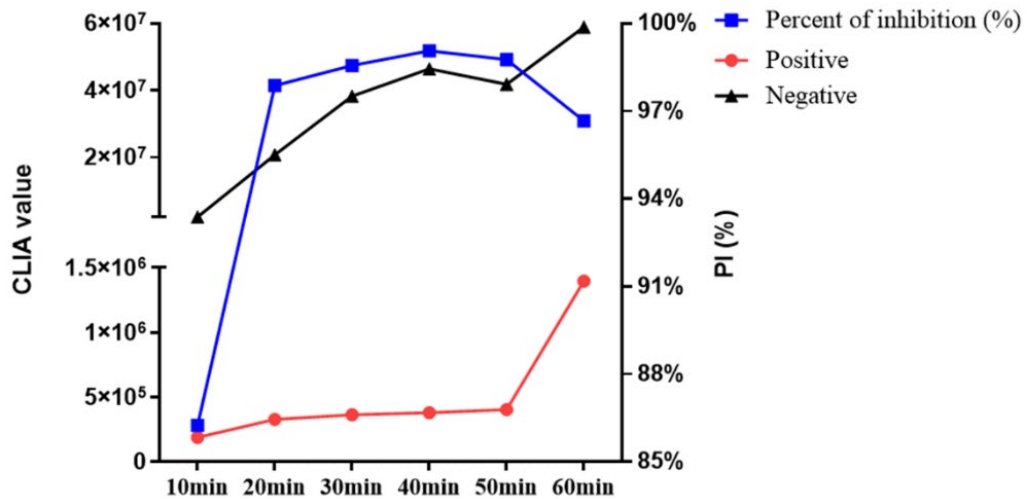


图 4-2 反应时间的优化

Fig. 4-2 Optimization of reaction time

4.3.2 p72-CLIA Cut off 值、Dsn、Dsp 的确定

使用上述优化的最佳条件来检测已知背景清楚的 432 份阴性猪血清和 58 份阳性猪血清，作 ROC 曲线 (图 4-3A) 和背景交互点图 (图 4-3B) 来确定 Cut off 值、Dsn 和 Dsp。结果显示当 Cut-off 值为 40% 时，Dsn 为 100%，Dsp 为 99.5%。

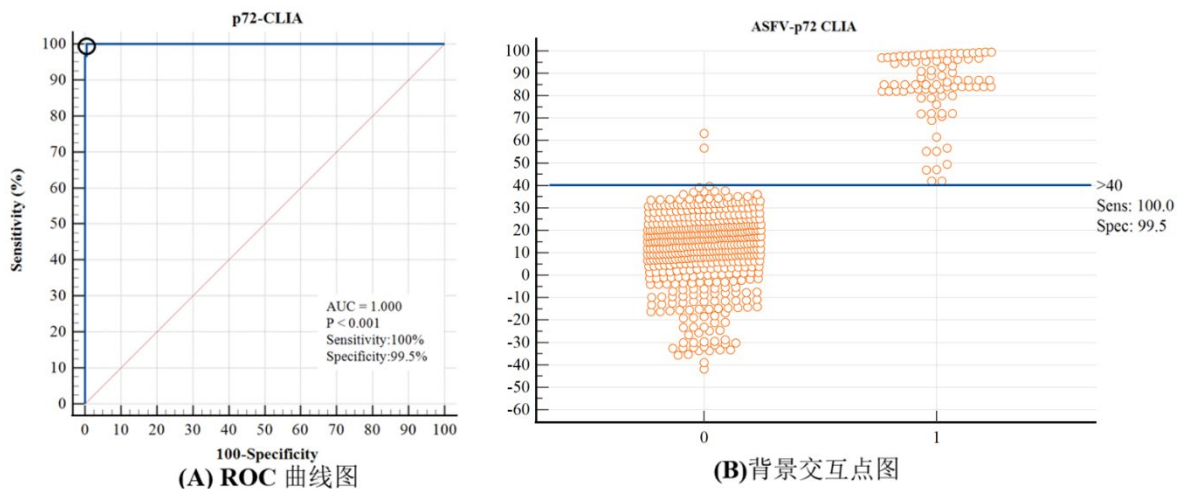


图 4-3 p72-CLIA Cut-off 值的确定

Fig. 4-3 Determination of the Cut-off value for the p72-CLIA

图 A 为 ROC 曲线，图上的每个点代表特定阈值下的 Dsn 和 Dsp；图 B 为背景交互点图，0 为阴性血清样本，1 为阳性血清样本
A is the ROC curve, with each point on the graph representing the Dsn and Dsp at a specific threshold; B is a background cross-point plot, 0 represents a negative serum sample and 1 represents a positive serum sample

4.3.3 p72-CLIA 与商品化试剂盒检测性能对比

通过检测背景清楚的血清样本来评估 p72 CLIA 和 商品化阻断试剂盒的诊断性能。结果如表

4-1 所示, p72 CLIA 符合率为 100%, 而商品化试剂盒符合率为 92.5%。

表 4-1 p72-CLIA 与商品化试剂盒符合率对比

Table 4-1 Comparison of coincidence rates of p72-CLIA and commercial kit

样本来源	样本数量	p72-CLIA			商品化阻断试剂盒		
		阳性样本	阴性样本	准确率	阳性样本	阴性样本	准确率
感染阳性猪血清	40	40	0	100%	37	3	92.5%
阴性猪血清	66	0	66	100%	0	66	100%

4.3.4 p72-CLIA 灵敏度、重复性、特异性实验

使用 2 倍连续稀释的标准阳性猪血清样品测定 p72 CLIA 的灵敏度, 并与商品化阻断试剂盒进行比较 (图 4-4)。结果显示 p72 CLIA 检测限为 1:2,048; 商品化阻断 ELISA 盒的检测限为 1:1,024。因此, 结果表明 p72-CLIA 比商业试剂盒的灵敏度更高。

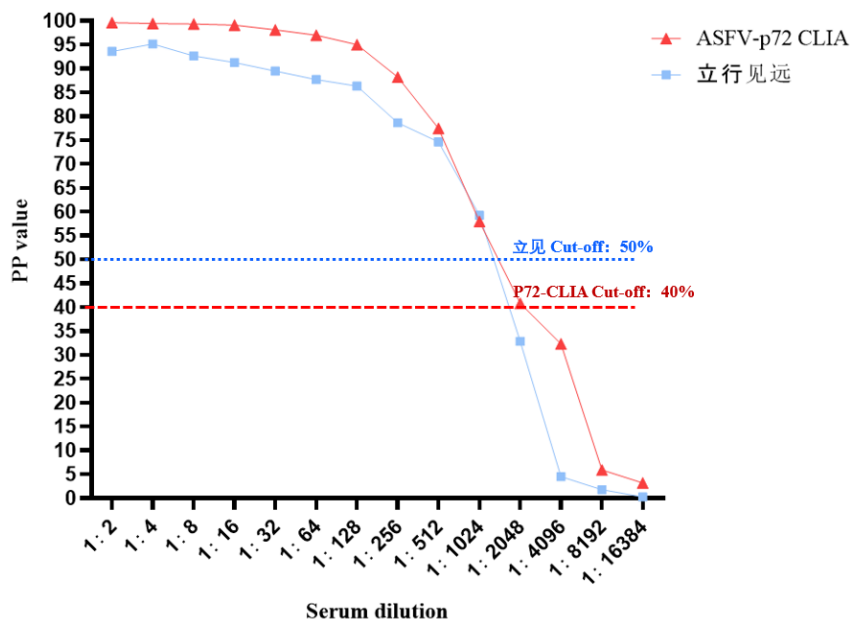


图 4-4 p72-CLIA 与商品化试剂盒灵敏度的对比

Fig. 4-4 Comparison of sensitivity between p72-CLIA and commercial kit

通过检测六份猪血清, p72 CLIA 的批内变异系数 (CV) 从 1.2% ~14% 不等, 批间 CV 从 3.6%~14% 不等。由于所有 CV 值均 \leq 14%, 该测定显示出良好的重复性 (表 4-2)。

表 4-2 p72-CLIA 的批内重复性和批间重复性

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

血清	批间			批内		
	平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)	平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)
1	3.35	0.46	13	3.82	0.54	14
2	3.84	0.53	13.8	4.87	0.59	12
3	18.56	0.84	4.5	11.05	0.79	7.1
4	15.92	1.78	11.2	10.44	1.02	9.7
5	98.52	3.57	3.6	97.45	1.15	1.2
6	23.33	3.27	14	27.18	0.80	2.9

为了评估已建立的 p72-CLIA 的特异性，测试了七种针对其他病毒（PCV2、PPV、FMDV、PRRSV、PDCOV、CSFV、PEDV）。结果显示 ASFV 阳性血清的 PI 值约为 99.4%，而其它非特异性阳性血清的 PI 值范围为 1.44%~31.6%，PI 值明显小于 Cut-off 值，表明开发的 p72-CLIA 与这些病毒感染血清无交叉反应。

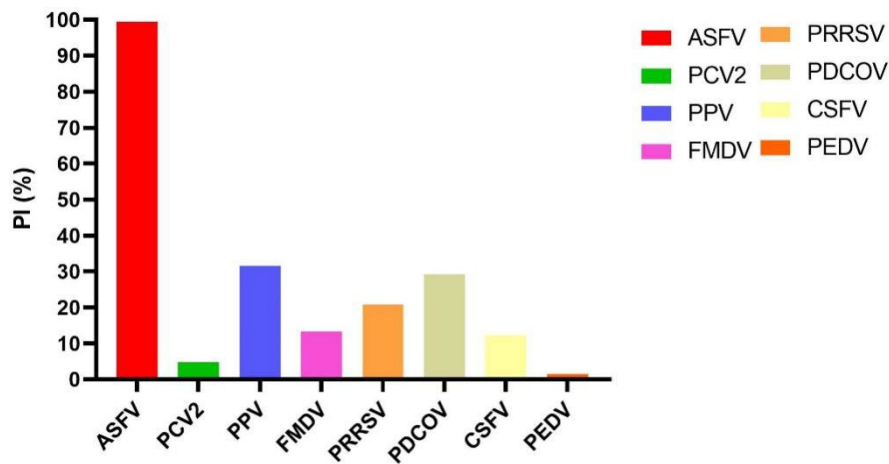


图 4-5 p72-CLIA 检测八种猪病毒的 PI 值

Fig. 4-5 PI values of eight porcine viruses after p72-CLIA detection

4.4 讨论

ASF 给全球生猪及相关产业造成了巨大损失。目前还没有商业化的 ASF 疫苗。因此，快速准确的实验室诊断技术为及早发现并控制 ASFV 的传播至关重要。近年来，由于 ASFV 基因组的高突变率，天然突变株表现出低毒力和高传播性 (SUN et al., 2021)，使针对核酸或蛋白的诊断准

确性逐渐降低。因此，特异性抗体的检测对 ASFV 诊断至关重要。

目前研究中已经开发了多种用于检测 ASFV 特异性抗体的血清学诊断技术，如 ELISA (LV et al., 2021; ZHAO et al., 2022)、免疫印迹 (KAZAKOVA et al., 2017)、间接免疫过氧化物酶试验 (IPT) (CARMINA et al., 2022) 和横向流动试验 (LFT) (ZHU et al., 2021) 等。其中 ELISA 是当前最常用的血清学检测方法，而且也是 OIE 推荐使用的方法，但它存在耗时长和容易出现假阳性等的缺点 (GAUDREAU et al., 2020)。而化学发光法由于其反应时不需要任何外置光源，不受背景杂散光的干扰，并且该方法的灵敏度高、特异性强、方法简便快速以及容易实现自动化。

对于理想的诊断候选靶标，Kollnberger 等 (KOLLNBERGER et al., 2002) 鉴定了 ASFV 的几种免疫原性蛋白，包括结构蛋白和非结构蛋白。其中，p72 被认为是抗体检测的候选靶标之一。并且由于其高度免疫原性，它被广泛用作开发诊断方法中的抗原 (CAIXIA et al., 2022; GENG et al., 2022; WAN et al., 2022)。基于 p72 的检测方法是目前市场上最灵敏的检测技术 (WANG et al., 2021b)。

因此，在本研究我们利用 mAb-2B8D7，开发了一种快速、准确检测 ASFV 抗体的化学发光免疫法 (p72-CLIA)。p72-CLIA 通过检测已知背景的猪血清，确定了 Cut-off 值为 40% 时，诊断敏感性 (Dsn) 为 100%，诊断特异性 (Dsp) 为 99.5%，比商品化阻断试剂盒的灵敏度和准确率更高。由于目前市场上商品化的 ELISA 试剂盒检测需要较长时间，如 INgezim PPA COMPAC ELISA 及立行见远阻断试剂盒，检测需要 1 h 30 min。近 20 年来，化学发光法作为最新的标记技术在兽医诊断中得到了广泛的应用。纳米诊断技术尤其是针对量子点的诊断技术在人医中受到了广泛关注。近年来，人们开始将生物标志物（如蛋白质、基因和化学发光剂）标记到纳米材料表面来提高化学发光的灵敏度 (PERVEEN et al., 2023)，并通过与侧流免疫测定 (LFA) 结合用于现场的即时检测 (POCT) (WANG et al., 2021a)。这为之后进一步发展 ASFV 的快速现场诊断提供了新参考。

总之，本研究基于 p72 mAb-2B8D7 开发了一种阻断 CLIA 方法，可以快速准确的检测针对 ASFV p72 的抗体。与传统的 ELISA 相比，该方法只需 45 分钟即可完成检测，而且，该方法还显示出了良好的 Dsn、Dsp 和重复性。因此，p72-cCLIA 为大规模筛查感染 ASFV 的猪并及时控制 ASFV 的传播提供了有利的工具。

第五章 全文结论

- 1、成功构建重组质粒 p72-SUMO，并成功表达及纯化了 p72 重组蛋白。
- 2、将纯化的 p72 蛋白免疫小鼠，最终获得 17 株能稳定分泌 p72 特异性抗体的单克隆抗体。
- 3、对 17 株单克隆抗体进行生物学特性分析，中和实验结果表明 17 株单克隆抗体并无显著的中和能力，共鉴定得到 7 个高度保守的线性 B 细胞表位，分别为 ¹⁹⁵VNGNSLDEYSS²⁰⁵、²⁷¹TNPKFLSQHF²⁸⁰、²⁸¹PENSHNIQTA²⁹⁰、²⁴⁹HKPHQSKPIL²⁵⁸、⁶⁹PVGFYENKV⁷⁷、¹⁵⁸VDPFGRPIV¹⁶⁶ 和 ²²³GYKHLVGQEV²³³。
- 4、基于 p72 mAb-2B8D7 建立了快速检测非洲猪瘟病毒 p72 抗体的阻断化学发光法，该方法的 Cut-off 值为 40%，Dsp 为 99.5%，Dsn 为 100%，具有较好的灵敏性、重复性及准确率，且与商品化试剂盒相比，检测时间较短，全程只需 45 min。

参考文献

- 哈登楚日亚, 樊晓旭, 赵永刚, 王淑娟, 张志诚, 戈胜强, 李林, 吴晓东, 王志亮, 2017. 非洲猪瘟病毒实时荧光重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法的建立. 中国畜牧兽医, 44(11): 3270-3277. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2017.11.023.
- 金茂俊, 邵华, 金芬, 王淼, 余永新, 王静, 2013. 基于磁性纳米粒子的免疫分析方法在食品安全检测中的研究进展. 安徽农业科学, 41(22): 9431-9432+9439. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2013.22.018.
- 刘伟, 2020. O型口蹄疫病毒抗体及3ABC抗体快速检测化学发光法的建立. 中国农业科学院.
- 任世奇, 王栩, 唐宝军, 胡国茂, 李振甲, 陈国南, 林金明, 2008. 微板式化学发光酶免疫分析法临床测定人血清中孕酮. 分析化学, (06): 729-734.
- 王涛, 孙元, 罗玉子, 仇华吉, 2018. 非洲猪瘟防控及疫苗研发:挑战与对策. 生物工程学报, 34(12): 1931-1942. DOI: 10.13345/j.cjb.180415.
- 吴海涛, 成大荣, 吴萌, 左伟勇, 洪伟鸣, 2018. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制. 黑龙江畜牧兽医, (17): 126-128+238. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.09.0190.
- 肖芳斌, 刘瑞, 占忠旭, 张干, 吴鑫, 许恒毅, 2019. 生物传感器在食源性致病菌检测中应用的研究进展. 生物工程学报, 35(09): 1581-1589. DOI: 10.13345/j.cjb.190048.
- 闫倩倩, 2021. 探讨多重PCR技术在食品检测中的应用与展望. 食品安全导刊, (18): 133+136. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2021.18.074.
- 张丽, 罗玉子, 王涛, 孙元, 仇华吉, 2019. 非洲猪瘟诊断技术发展现状与需求分析. 中国农业科技导报, 21(09): 1-11. DOI: 10.13304/j.nykjdb.2019.0209.
- 钟友好, 赵弟萍, 薛峰, 朱梦雅, 方威, 陈伟, 2014. 基于信号增敏型试纸条三聚氰胺超灵敏检测方法. 食品科学, 35(08): 289-294.
- 朱智壕, 葛丽雅, 涂晓波, 余超挺, 黄欣迪, 卞学海, 亓双, 张恒, 2015. 等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用进展. 食品安全质量检测学报, 6(12): 4787-4794. DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2015.12.018.
- AGüERO M, FERNÁNDEZ J, ROMERO L, SÁNCHEZ MASCARAQUE C, ARIAS M, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, 2003. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. J Clin Microbiol, 41(9): 4431-4434. DOI: 10.1128/jcm.41.9.4431-4434.2003.
- ALCARAZ C, RODRIGUEZ F, OVIEDO J M, EIRAS A, DE DIEGO M, ALONSO C, ESCRIBANO J M, 1995. Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54. J Virol Methods, 52(1-2): 111-119. DOI: 10.1016/0166-0934(94)00150-f.
- ALONSO C, BORCA M, DIXON L, REVILLA Y, RODRIGUEZ F, ESCRIBANO J M, ICTV REPORT C, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. J Gen Virol, 99(5): 613-614. DOI: 10.1099/jgv.0.001049.
- ANDRÉS G, CHARRO D, MATAMOROS T, DILLARD R S, ABRESCIA N G A, 2020. The cryo-EM

- structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes. *J Biol Chem*, 295(1): 1-12. DOI: 10.1074/jbc.AC119.011196.
- ASHENAGAR M S, MATSUMOTO A, SAKAI H, TOKIYA M, HARA M, HIROTA Y, 2022. Comparison of CLEIA and ELISA for SARS-CoV-2 Virus Antibodies after First and Second Dose Vaccinations with the BNT162b2 mRNA Vaccine. *Vaccines (Basel)*, 10(4). DOI: 10.3390/vaccines10040487.
- BAI J, LIN H, LI H, ZHOU Y, LIU J, ZHONG G, WU L, JIANG W, DU H, YANG J, XIE Q, HUANG L, 2019. Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of African Swine Fever. *Front Microbiol*, 10: 2830. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02830.
- BALLESTER M, GALINDO-CARDIEL I, GALLARDO C, ARGILAGUET J M, SEGALÉS J, RODRÍGUEZ J M, RODRÍGUEZ F, 2010. Intranuclear detection of African swine fever virus DNA in several cell types from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a new in situ hybridisation protocol. *J Virol Methods*, 168(1-2): 38-43. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.04.013.
- BASTO A P, PORTUGAL R S, NIX R J, CARTAXEIRO C, BOINAS F, DIXON L K, LEITÃO A, MARTINS C, 2006. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch Virol*, 151(4): 819-826. DOI: 10.1007/s00705-005-0654-2.
- BEATO M S, D'ERRICO F, ISCARO C, PETRINI S, GIAMMARIOLI M, FELIZIANI F, 2022. Disinfectants against African Swine Fever: An Updated Review. *Viruses*, 14(7). DOI: 10.3390/v14071384.
- BENTOLILA L A, WEISS S, 2006. Single-step multicolor fluorescence in situ hybridization using semiconductor quantum dot-DNA conjugates. *Cell Biochem Biophys*, 45(1): 59-70. DOI: 10.1385/cbb:45:1:59.
- BERSON S A, YALLOW R S, 1961. Immunochemical distinction between insulins with identical amino-acid sequences. *Nature*, 191: 1392-1393. DOI: 10.1038/1911392a0.
- BIAGETTI M, CUCCIOLONI M, BONFILI L, CECARINI V, SEBASTIANI C, CURCIO L, GIAMMARIOLI M, DE MIA G M, ELEUTERI A M, ANGELETTI M, 2018. Chimeric DNA/LNA-based biosensor for the rapid detection of African swine fever virus. *Talanta*, 184: 35-41. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.095.
- BORCA M V, IRUSTA P, CARRILLO C, AFONSO C L, BURRAGE T, ROCK D L, 1994. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology*, 201(2): 413-418. DOI: 10.1006/viro.1994.1311.
- BORCA M V, O'DONNELL V, HOLINKA L G, RISATTI G R, RAMIREZ-MEDINA E, VUONO E A, SHI J, PRUITT S, RAI A, SILVA E, VELAZQUEZ-SALINAS L, GLADUE D P, 2020. Deletion of CD2-like gene from the genome of African swine fever virus strain Georgia does not attenuate virulence in swine. *Sci Rep*, 10(1): 494. DOI: 10.1038/s41598-020-57455-3.
- CAKETT G, MATELSKA D, SÝKORA M, PORTUGAL R, MALECKI M, BÄHLER J, DIXON L,

- WERNER F, 2020. The African Swine Fever Virus Transcriptome. *J Virol*, 94(9). DOI: 10.1128/jvi.00119-20.
- CADENAS-FERNÁNDEZ E, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, KOSOWSKA A, RIVERA B, MAYORAL-ALEGRE F, RODRÍGUEZ-BERTOS A, YAO J, BRAY J, LOKHANDWALA S, MWANGI W, BARASONA J A, 2020. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus Antigens Cocktail Is Not Protective against Virulent Arm07 Isolate in Eurasian Wild Boar. *Pathogens*, 9(3). DOI: 10.3390/pathogens9030171.
- CADENAS-FERNÁNDEZ E, ITO S, AGUILAR-VEGA C, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, BOSCH J, 2022. The Role of the Wild Boar Spreading African Swine Fever Virus in Asia: Another Underestimated Problem. *Front Vet Sci*, 9: 844209. DOI: 10.3389/fvets.2022.844209.
- CAIXIA W, SONGYIN Q, YING X, HAOYANG Y, HAOXUAN L, SHAOQIANG W, CHUNYAN F, XIANGMEI L, 2022. Development of a Blocking ELISA Kit for Detection of ASFV Antibody Based on a Monoclonal Antibody Against Full-Length p72. *J AOAC Int*, 105(5): 1428-1436. DOI: 10.1093/jaoacint/qsac050.
- CARMINA G, NIETO R, ARIAS M, 2022. Indirect Immunoperoxidase Test (IPT) for Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus (ASFV) on African Green Monkey Cell Lines (Vero, MS). *Methods Mol Biol*, 2503: 147-158. DOI: 10.1007/978-1-0716-2333-6_10.
- CARRASCOSA A L, SANTARÉN J F, VIÑUELA E, 1982. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods*, 3(6): 303-310. DOI: 10.1016/0166-0934(82)90034-9.
- COSTARD S, WIELAND B, DE GLANVILLE W, JORI F, ROWLANDS R, VOSLOO W, ROGER F, PFEIFFER D U, DIXON L K, 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1530): 2683-2696. DOI: 10.1098/rstb.2009.0098.
- CUBILLOS C, GÓMEZ-SEBASTIAN S, MORENO N, NUÑEZ M C, MULUMBA-MFUMU L K, QUEMBO C J, HEATH L, ETTER E M, JORI F, ESCRIBANO J M, BLANCO E, 2013. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res*, 173(1): 159-167. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.021.
- DANZETTA M L, MARENZONI M L, IANNETTI S, TIZZANI P, CALISTRI P, FELIZIANI F, 2020. African Swine Fever: Lessons to Learn From Past Eradication Experiences. A Systematic Review. *Front Vet Sci*, 7: 296. DOI: 10.3389/fvets.2020.00296.
- DIXON L K, CHAPMAN D A, NETHERTON C L, UPTON C, 2013. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 173(1): 3-14. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.020.
- ESCRIBANO J M, GALINDO I, ALONSO C, 2013. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. *Virus Res*, 173(1): 101-109. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.012.
- FENG X L, REN H L, LI Y S, HU P, ZHOU Y, LIU Z S, YAN D M, HUI Q, LIU D, LIN C, LIU N N, LIU Y Y, LU S Y, 2014. A magnetic particles-based chemiluminescence enzyme immunoassay for rapid detection of ovalbumin. *Anal Biochem*, 459: 12-17. DOI: 10.1016/j.ab.2014.04.016.
- FRĄCZYK M, WOŹNIAKOWSKI G, KOWALCZYK A, NIEMCZUK K, PEJSKAK Z, 2016.

- Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus, in pig and wild boar blood and sera samples. *Lett Appl Microbiol*, 62(5): 386-391. DOI: 10.1111/lam.12569.
- FRANZONI G, ZINELLU S, RAZZUOLI E, MURA L, DE CIUCIS C G, DE PAOLIS L, CARTA T, ANFOSSI A G, GRAHAM S P, CHESSA B, DEI GIUDICI S, OGGIANO A, 2022. Assessment of the Impact of a Toll-like Receptor 2 Agonist Synthetic Lipopeptide on Macrophage Susceptibility and Responses to African Swine Fever Virus Infection. *Viruses*, 14(10). DOI: 10.3390/v14102212.
- FU H J, YUAN L P, SHEN Y D, LIU Y X, LIU B, ZHANG S W, XIE Z X, LEI H T, SUN Y M, XU Z L, 2018. A full-automated magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for rapid detection of cortisol in milk. *Anal Chim Acta*, 1035: 129-135. DOI: 10.1016/j.aca.2018.06.015.
- GALLARDO C, BLANCO E, RODRÍGUEZ J M, CARRASCOSA A L, SANCHEZ-VIZCAINO J M, 2006. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*, 44(3): 950-956. DOI: 10.1128/jcm.44.3.950-956.2006.
- GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, MALTA J, SOLER A, BLANCO E, PARKHOUSE R M, LEITÃO A, 2009. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16(7): 1012-1020. DOI: 10.1128/cvi.00408-08.
- GAUDREAULT N N, MADDEN D W, WILSON W C, TRUJILLO J D, RICHT J A, 2020. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Front Vet Sci*, 7: 215. DOI: 10.3389/fvets.2020.00215.
- GENG R, SUN Y, LI R, YANG J, MA H, QIAO Z, LU Q, QIAO S, ZHANG G, 2022. Development of a p72 trimer-based colloidal gold strip for detection of antibodies against African swine fever virus. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(7): 2703-2714. DOI: 10.1007/s00253-022-11851-z.
- GIAMMARIOLI M, PELLEGRINI C, CASCIARI C, DE MIA G M, 2008. Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet Res Commun*, 32(3): 255-262. DOI: 10.1007/s11259-007-9026-6.
- GIMÉNEZ-LIROLA L G, MUR L, RIVERA B, MOGLER M, SUN Y, LIZANO S, GOODELL C, HARRIS D L, ROWLAND R R, GALLARDO C, SÁNCHEZ-VIZCAINO J M, ZIMMERMAN J, 2016. Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. *PLoS One*, 11(9): e0161230. DOI: 10.1371/journal.pone.0161230.
- HALMANN M, VELAN B, SERY T, 1977. Rapid identification and quantitation of small numbers of microorganisms by a chemiluminescent immunoreaction. *Appl Environ Microbiol*, 34(5): 473-477. DOI: 10.1128/aem.34.5.473-477.1977.
- HAWES P C, NETHERTON C L, WILEMAN T E, MONAGHAN P, 2008. The envelope of intracellular African swine fever virus is composed of a single lipid bilayer. *J Virol*, 82(16): 7905-7912. DOI: 10.1128/jvi.00194-08.
- HEIMERMAN M E, MURGIA M V, WU P, LOWE A D, JIA W, ROWLAND R R, 2018. Linear epitopes in African swine fever virus p72 recognized by monoclonal antibodies prepared against baculovirus-

- expressed antigen. *J Vet Diagn Invest*, 30(3): 406-412. DOI: 10.1177/1040638717753966.
- HERNÁEZ B, TARRAGÓ T, GIRALT E, ESCRIBANO J M, ALONSO C, 2010. Small peptide inhibitors disrupt a high-affinity interaction between cytoplasmic dynein and a viral cargo protein. *J Virol*, 84(20): 10792-10801. DOI: 10.1128/jvi.01168-10.
- ISCARO C, CAMBIOTTI V, BESSI O, PACELLI F, RUOCCO L, FELIZIANI F, 2022. Analysis of surveillance and prevention plan for African Swine Fever in Italy in 2020. *Vet Med Sci*, 8(4): 1502-1508. DOI: 10.1002/vms3.824.
- JIA N, OU Y, PEJSAK Z, ZHANG Y, ZHANG J, 2017. Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection. *J Vet Res*, 61(2): 135-143. DOI: 10.1515/jvetres-2017-0017.
- KALMAR I D, CAY A B, TIGNON M, 2018. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma. *Vet Microbiol*, 219: 144-149. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.025.
- 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.
- KING D P, REID S M, HUTCHINGS G H, GRIERSON S S, WILKINSON P J, DIXON L K, BASTOS A D, DREW T W, 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*, 107(1): 53-61. DOI: 10.1016/s0166-0934(02)00189-1.
- KOLESOVA O, TOMASSETTI F, CERINI P, FINUCCI D, TURCHETTI G, CAPOGRECO F, BERNARDINI S, CALUGI G, PIERI M, 2022. Evaluation of ECLIA antigen detection tests as screening methods for COVID-19 in comparison with molecular analysis. *Ir J Med Sci*, 191(5): 2213-2217. DOI: 10.1007/s11845-021-02863-1.
- KOLLNBERGER S D, GUTIERREZ-CASTAÑEDA B, FOSTER-CUEVAS M, CORTEYN A, PARKHOUSE R M E, 2002. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J Gen Virol*, 83(Pt 6): 1331-1342. DOI: 10.1099/0022-1317-83-6-1331.
- KOMBE KOMBE A J, XIE J, ZAHID A, MA H, XU G, DENG Y, NSOLE BITEGHE F A, MOHAMMED A, DAN Z, YANG Y, FENG C, ZENG W, CHANG R, ZHU K, ZHANG S, JIN T, 2022. Detection of Circulating VZV-Glycoprotein E-Specific Antibodies by Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) for Varicella-Zoster Diagnosis. *Pathogens*, 11(1). DOI: 10.3390/pathogens11010066.
- LI Z, CHEN W, QIU Z, LI Y, FAN J, WU K, LI X, ZHAO M, DING H, FAN S, CHEN J, 2022. African Swine Fever Virus: A Review. *Life (Basel)*, 12(8). DOI: 10.3390/life12081255.
- LITHGOW P, TAKAMATSU H, WERLING D, DIXON L, CHAPMAN D, 2014. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection. *Vet Microbiol*, 168(2-4): 413-419. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.

- LIU Q, MA B, QIAN N, ZHANG F, TAN X, LEI J, XIANG Y, 2019. Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72. *Cell Res*, 29(11): 953-955. DOI: 10.1038/s41422-019-0232-x.
- LOKHANDWALA S, WAGHELA S D, BRAY J, MARTIN C L, SANGEWAR N, CHARENDOFF C, SHETTI R, ASHLEY C, CHEN C H, BERGHMAN L R, MWANGI D, DOMINOWSKI P J, FOSS D L, RAI S, VORA S, GABBERT L, BURRAGE T G, BRAKE D, NEILAN J, MWANGI W, 2016. Induction of Robust Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens. *Clin Vaccine Immunol*, 23(11): 888-900. DOI: 10.1128/cvi.00395-16.
- LOPERA-MADRID J, OSORIO J E, HE Y, XIANG Z, ADAMS L G, LAUGHLIN R C, MWANGI W, SUBRAMANYA S, NEILAN J, BRAKE D, BURRAGE T G, BROWN W C, CLAVIJO A, BOUNPHENG M A, 2017. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine. *Vet Immunol Immunopathol*, 185: 20-33. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.01.004.
- LUO Y, ATIM S A, SHAO L, AYEBAZIBWE C, SUN Y, LIU Y, JI S, MENG X Y, LI S, LI Y, MASEMBE C, STÅHL K, WIDÉN F, LIU L, QIU H J, 2017. Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus. *Arch Virol*, 162(1): 191-199. DOI: 10.1007/s00705-016-3069-3.
- 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). DOI: 10.3390/life1111214.
- MALMQUIST W A, HAY D, 1960. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res*, 21: 104-108.
- MERCER J, SCHELHAAS M, HELENIUS A, 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 79: 803-833. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
- MIAO F, ZHANG J, LI N, CHEN T, WANG L, ZHANG F, MI L, ZHANG J, WANG S, WANG Y, ZHOU X, ZHANG Y, LI M, ZHANG S, HU R, 2019. Rapid and Sensitive Recombinase Polymerase Amplification Combined With Lateral Flow Strip for Detecting African Swine Fever Virus. *Front Microbiol*, 10: 1004. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01004.
- MIRASOLI M, GUARDIGLI M, MICHELINI E, RODA A, 2014. Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal*, 87: 36-52. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.008.
- OURA C A, EDWARDS L, BATTEN C A, 2013. Virological diagnosis of African swine fever--comparative study of available tests. *Virus Res*, 173(1): 150-158. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.022.
- PERVEEN S, NEGI A, GOPALAKRISHNAN V, PANDA S, SHARMA V, SHARMA R, 2023. COVID-19 diagnostics: Molecular biology to nanomaterials. *Clin Chim Acta*, 538: 139-156. DOI: 10.1016/j.cca.2022.11.017.
- 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.

- PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, ARMES N A, 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 4(7): e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204.
- QU H, GE S, ZHANG Y, WU X, WANG Z, 2022. A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus. *Virus Genes*, 58(2): 77-87. DOI: 10.1007/s11262-021-01879-0.
- RAMIREZ-MEDINA E, O'DONNELL V, SILVA E, ESPINOZA N, VELAZQUEZ-SALINAS L, MORAN K, DAITE D A, BARRETTE R, FABURAY B, HOLLAND R, GLADUE D P, BORCA M V, 2022. Experimental Infection of Domestic Pigs with an African Swine Fever Virus Field Strain Isolated in 2021 from the Dominican Republic. *Viruses*, 14(5). DOI: 10.3390/v14051090.
- REIS A L, PARKHOUSE R M E, PENEDOS A R, MARTINS C, LEITÃO A, 2007. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *J Gen Virol*, 88(Pt 9): 2426-2434. DOI: 10.1099/vir.0.82857-0.
- REVILLA Y, PÉREZ-NÚÑEZ D, RICHT J A, 2018. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches. *Adv Virus Res*, 100: 41-74. DOI: 10.1016/bs.aivir.2017.10.002.
- RICHTER M M, 2004. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev*, 104(6): 3003-3036. DOI: 10.1021/cr020373d.
- RODRIGUEZ F, ALCARAZ C, EIRAS A, YÁÑEZ R J, RODRIGUEZ J M, ALONSO C, RODRIGUEZ J F, ESCRIBANO J M, 1994. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol*, 68(11): 7244-7252. DOI: 10.1128/jvi.68.11.7244-7252.1994.
- RODRÍGUEZ J M, GARCÍA-ESCUADERO R, SALAS M L, ANDRÉS G, 2004. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol*, 78(8): 4299-1313. DOI: 10.1128/jvi.78.8.4299-4313.2004.
- ROWLANDS R J, DUARTE M M, BOINAS F, HUTCHINGS G, DIXON L K, 2009. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology*, 393(2): 319-328. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.040.
- RUIZ-SAENZ J, DIAZ A, BONILLA-ALDANA D K, RODRÍGUEZ-MORALES A J, MARTINEZ-GUTIERREZ M, AGUILAR P V, 2022. African swine fever virus: A re-emerging threat to the swine industry and food security in the Americas. *Front Microbiol*, 13: 1011891. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1011891.
- SALVAGNO G L, HENRY B M, DE NITTO S, PIGHI L, LIPPI G, 2022. Clinical performance of Fujirebio Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag chemiluminescent immunoassay. *New Microbiol*, 45(4): 353-354.
- SÁNCHEZ E G, QUINTAS A, NOGAL M, CASTELLÓ A, REVILLA Y, 2013. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res*, 173(1): 58-75. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.025.
- SASTRE P, GALLARDO C, MONEDERO A, RUIZ T, ARIAS M, SANZ A, RUEDA P, 2016. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Vet Res*, 12: 206. DOI: 10.1186/s12917-016-0831-4.

- SHIMMON G L, HUI J Y K, WILEMAN T E, NETHERTON C L, 2021. Autophagy impairment by African swine fever virus. *J Gen Virol*, 102(8). DOI: 10.1099/jgv.0.001637.
- SILVA E B, KRUG P W, RAMIREZ-MEDINA E, VALLADARES A, RAI A, ESPINOZA N, GLADUE D P, BORCA M V, 2022. The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV live Attenuated Vaccine Candidates. *Pathogens*, 11(11). DOI: 10.3390/pathogens11111311.
- SUN E, HUANG L, ZHANG X, ZHANG J, SHEN D, ZHANG Z, WANG Z, HUO H, WANG W, HUANGFU H, WANG W, LI F, LIU R, SUN J, TIAN Z, XIA W, GUAN Y, HE X, ZHU Y, ZHAO D, BU Z, 2021. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg Microbes Infect*, 10(1): 2183-2193. DOI: 10.1080/22221751.2021.1999779.
- TAO D, SUN D, LIU Y, WEI S, YANG Z, AN T, SHAN F, CHEN Z, LIU J, 2020. One year of African swine fever outbreak in China. *Acta Trop*, 211: 105602. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105602.
- TEIMOURI A, MODARRESSI M H, SHOJAEE S, MOHEBALI M, ZOU EI N, REZAIAN M, KESHAVARZ H, 2018. Detection of toxoplasma-specific immunoglobulin G in human sera: performance comparison of in house Dot-ELISA with ECLIA and ELISA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37(8): 1421-1429. DOI: 10.1007/s10096-018-3266-y.
- TIWARI A K, UPADHYAY A P, ARORA D, WADHWA T, AGGARWAL G, PABBI S, LUTHRA A S, RAWAT S S, 2020. Head-to-head comparison of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Enhanced Chemiluminescence Immunoassay (ECLIA) for the detection of Transfusion Transmitted Disease (TTD) Markers; HIV, HCV and HBV in blood donors, in India. *J Virol Methods*, 285: 113962. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113962.
- VERGNE T, KORENNOY F, COMBELLES L, GOGIN A, PFEIFFER D U, 2016. Modelling African swine fever presence and reported abundance in the Russian Federation using national surveillance data from 2007 to 2014. *Spat Spatiotemporal Epidemiol*, 19: 70-77. DOI: 10.1016/j.sste.2016.06.002.
- VIDAL M I, STIENE M, HENKEL J, BILITEWSKI U, COSTA J V, OLIVA A G, 1997. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies. *J Virol Methods*, 66(2): 211-218. DOI: 10.1016/s0166-0934(97)00059-1.
- WAN Y, SHI Z, PENG G, WANG L, LUO J, RU Y, ZHOU G, MA Y, SONG R, YANG B, CAO L, TIAN H, ZHENG H, 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 C, SHI D, WAN N, YANG X, LIU H, GAO H, ZHANG M, BAI Z, LI D, DAI E, RONG Z, WANG S, 2021a. Development of spike protein-based fluorescence lateral flow assay for the simultaneous detection of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG. *Analyst*, 146(12): 3908-3917. DOI: 10.1039/d1an00304f.
- WANG F, MA C, ZENG X, LI C, DENG Y, HE N, 2012. Chemiluminescence molecular detection of sequence-specific HBV-DNA using magnetic nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*, 8(5): 786-790.

- DOI: 10.1166/jbn.2012.1446.
- WANG G, XIE M, WU W, CHEN Z, 2021b. Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins. *Viruses*, 13(11). DOI: 10.3390/v13112124.
- WANG N, ZHAO D, WANG J, ZHANG Y, WANG M, GAO Y, LI F, WANG J, BU Z, RAO Z, WANG X, 2019. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly. *Science*, 366(6465): 640-644. DOI: 10.1126/science.aaz1439.
- WANG Y, XU L, NOLL L, STOY C, PORTER E, FU J, FENG Y, PEDDIREDDI L, LIU X, DODD K A, JIA W, BAI J, 2020. Development of a real-time PCR assay for detection of African swine fever virus with an endogenous internal control. *Transbound Emerg Dis*, 67(6): 2446-2454. DOI: 10.1111/tbed.13582.
- WANG Y, DAI J, LIU Y, YANG J, HOU Q, OU Y, DING Y, MA B, CHEN H, LI M, SUN Y, ZHENG H, ZHANG K, WUBSHET A K, ZABEREZHNY A D, ALIPER T I, TARASIUK K, PEJSAK Z, LIU Z, ZHANG Y, ZHANG J, 2021c. Development of a Potential Pense Colorimetric LAMP Assay Using Neutral Red for Detection of African Swine Fever Virus. *Front Microbiol*, 12: 609821. DOI: 10.3389/fmicb.2021.609821.
- WANG Y, KANG W, YANG W, ZHANG J, LI D, ZHENG H, 2021d. Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review. *Front Immunol*, 12: 715582. DOI: 10.3389/fimmu.2021.715582.
- WANG Z, YU W, XIE R, YANG S, CHEN A, 2021e. A strip of lateral flow gene assay using gold nanoparticles for point-of-care diagnosis of African swine fever virus in limited environment. *Anal Bioanal Chem*, 413(18): 4665-4672. DOI: 10.1007/s00216-021-03408-2.
- WU J, MUKAMA O, WU W, LI Z, HABIMANA J D, ZHANG Y, ZENG R, NIE C, ZENG L, 2020a. A CRISPR/Cas12a Based Universal Lateral Flow Biosensor for the Sensitive and Specific Detection of African Swine-Fever Viruses in Whole Blood. *Biosensors (Basel)*, 10(12). DOI: 10.3390/bios10120203.
- WU K, LIU J, WANG L, FAN S, LI Z, LI Y, YI L, DING H, ZHAO M, CHEN J, 2020b. Current State of Global African Swine Fever Vaccine Development under the Prevalence and Transmission of ASF in China. *Vaccines (Basel)*, 8(3). DOI: 10.3390/vaccines8030531.
- WU P, LOWE A D, RODRÍGUEZ Y Y, MURGIA M V, DODD K A, ROWLAND R R, JIA W, 2020c. Antigenic regions of African swine fever virus phosphoprotein P30. *Transbound Emerg Dis*. DOI: 10.1111/tbed.13533.
- WU X, XIAO L, LIN H, CHEN S, YANG M, AN W, WANG Y, YANG Z, YAO X, TANG Z, 2018. Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus. *Can J Vet Res*, 82(1): 70-74.
- YANG S, MIAO C, LIU W, ZHANG G, SHAO J, CHANG H, 2023. Structure and function of African swine fever virus proteins: Current understanding. *Front Microbiol*, 14: 1043129. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1043129.
- YIN D, GENG R, SHAO H, YE J, QIAN K, CHEN H, QIN A, 2022. Identification of novel linear epitopes

- in P72 protein of African swine fever virus recognized by monoclonal antibodies. *Front Microbiol*, 13: 1055820. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1055820.
- ZHANG G, LIU W, GAO Z, YANG S, ZHOU G, CHANG Y, MA Y, LIANG X, SHAO J, CHANG H, 2021a. Antigenicity and immunogenicity of recombinant proteins comprising African swine fever virus proteins p30 and p54 fused to a cell-penetrating peptide. *Int Immunopharmacol*, 101(Pt A): 108251. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108251.
- ZHANG H, QI S, 2011. A rapid and sensitive chemiluminescence immunoassay based on magnetic particles for squamous cell carcinoma antigen in human serum. *Clin Chim Acta*, 412(17-18): 1572-1577. DOI: 10.1016/j.cca.2011.05.005.
- ZHANG K, LI S, LIU S, LI S, QU L, GAO G F, QIU H J, 2021b. Spatiotemporally Orchestrated Interactions between Viral and Cellular Proteins Involved in the Entry of African Swine Fever Virus. *Viruses*, 13(12). DOI: 10.3390/v13122495.
- 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. *Virology*, 37(6): 922-933. DOI: 10.1016/j.virus.2022.09.004.
- ZHU W, MENG K, ZHANG Y, BU Z, ZHAO D, MENG G, 2021. Lateral Flow Assay for the Detection of African Swine Fever Virus Antibodies Using Gold Nanoparticle-Labeled Acid-Treated p72. *Front Chem*, 9: 804981. DOI: 10.3389/fchem.2021.804981.
- ZHU Y S, SHAO N, CHEN J W, QI W B, LI Y, LIU P, CHEN Y J, BIAN S Y, ZHANG Y, TAO S C, 2020. Multiplex and visual detection of African Swine Fever Virus (ASFV) based on Hive-Chip and direct loop-mediated isothermal amplification. *Anal Chim Acta*, 1140: 30-40. DOI: 10.1016/j.aca.2020.10.011.
- ZSAK L, ONISK D V, AFONSO C L, ROCK D L, 1993. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virology*, 196(2): 596-602. DOI: 10.1006/viro.1993.1515.
- ZSAK L, BORCA M V, RISATTI G R, ZSAK A, FRENCH R A, LU Z, KUTISH G F, NEILAN J G, CALLAHAN J D, NELSON W M, ROCK D L, 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43(1): 112-119. DOI: 10.1128/jcm.43.1.112-119.2005.

附录 A

p72 基因:

5'-

ATGGCTTCAGGGGGAGCATTGTTGTCTAATAGCGAATGATGGTAAGGCAGATAAGATCATCCTT
GCCCAAGACCTGTTGAATAGCCGTATCTCTAACATCAAGAACGTCAATAAAAGCTATGGCAA
ACCGGACCCGGAACCGACGCTGTCCCAAATTGAGGAAACCCATCTGGTGCATTTTAATGCG
CACTTCAAACCGTATGTTCCGGTGGGCTTTGAATACAATAAGGTGCGCCACACACCGGCAC
TCCGACGCTGGGTAATAAGTTGACCTTCGGCATTCCGCAATATGGTGACTTTTTCCACGACAT
GGTTGGCCACCATATTCTGGGTGCATGTCATAGCAGCTGGCAGGACGCGCCCATCCAAGGTA
CGAGCCAAATGGGTGCGCACGGCCAGCTGCAGACCTTCCGCGTAACGGCTACGACTGGGA
TAATCAGACCCCGTTGGAAGGTGCGGTGTACACCCTGGTCGATCCGTTTGGCCGTCCGATTG
TTCCGGGTACCAAAAACGCGTATCGTAACCTCGTCTATTACTGCGAATACCCGGGCGAGCGC
CTGTACGAAAACGTTTCGTTTTGATGTGAATGGCAACTCTCTGGATGAGTATTCCAGCGATGTT
ACCACCCTCGTGCCTAAATTCTGTATCCCGGGCGATAAAATGACCGGTTATAAACATCTGGTC
GGTCAGGAGGTGTCCGTTGAAGGCACCTCTGGTCCGCTGTTGTGCAACATCCACGATCTGC
ATAAGCCGCATCAATCCAAACCGATCCTAACTGACGAGAACGACACCCAGCGTACGTGCAG
CCATAACAACCCGAAGTTTCTGAGCCAGCACTTCCGGAAAACAGCCACAACATCCAGACC
GCTGGTAAACAGGACATCACCCCGATTACCGACGCAACCTACCTGGACATTTCGTCGTAACGT
GCACTACTCCTGTAATGGCCCTCAGACCCCGAAGTATTATCAGCCACCGCTGGCTCTCTGGA
TTAAGCTGCGCTTCTGGTTCAACGAGAACGTCAACCTGGCGATCCCGTCCGTTTCTATCCCG
TTTGGTGAACGTTTCATCACCATTAAGCTGGCAAGCCAAAAGATCTTGTAATGAGTTTCC
TGGTCTGTTTCGTTCCGAGAGCAGATTTATCGCTGGTCGTCCAAGTCGCAGAAACATTTCGCT
TCAAGCCGTGGTTTATCCAGGAGTTATTAACGAGATCTCGTTGACCAACAACGAGCTGTAC
ATAACAACCTGTTTGTACCCCGGAGATTCACAATCTGTTTCGTGAAACGTGTTTCGTTTCAG
CCTGATCCGCGTGCACAAGACTCAAGTTACCCATACTAATAATAACCACCACGACGAGAAAC
TGATGTCAGCTTTGAAGTGGCCGATCGAATACATGTTTATAGGGCTGAAACCAACCTGGAAT
ATCTCCGACCAGAACCCGCACCAGCATCGTGATTGGCATAAATTCGGTCATGTTGTGAACGC
CATTATGCAACCGACACATCACGCGGAAATCTCTTTTCAGGATAGAGACACCGCCTTACCGG
ACGCGTGCAGCAGCATTCTGATATCTCTCCGGTGACGTACCCGATTACTCTGCCGATCATT
AGAACATCTCCGTTACCGCGCACGGCATCAACCTGATTGACAAGTTCCCGAGCAAATTCTGC
AGCTCGTACATTCCGTTCCACTATGGTGGTAACGCCATCAAGACCCCGGATGATCCTGGCGC
AATGATGATTACGTTTGCCTGAAACCGCGTGAGGAGTACCAACCGAGCGGTCACATCAAC
GTTTCACGCGCGCGTGAGTTCTATATCAGTTGGGACACGGACTACGTGGGTAGCATTACTAC
GGCCGACTTGGTCGTGAGCGCGTCCGCGATCAATTTCTTGTGTTGCAAAACGGCAGCGCT
GTTCTGCGTTATAGCACC -3'

pET-SUMO 载体:

5'-

CAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAA
ACAAGCGCTCATGAGCCC GAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCGATAT
AGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAG
GATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAA
CAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCAGC
CATCATCATCATCACGGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGCTAGCATGTCGGACTC
AGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACAT
CAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTT
TAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATT
CTTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATA
ACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTAGACAAGCTTAGGTATTTATTCGG
CGCAAAGTGCCTCGGGTGTGCTGCCAACTTAGcTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAG
ATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGA
ACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTG
GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTT
CTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC
TTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTATG
GTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG
TTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCT
TTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
AAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTTCGGGGAA
ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAA
TTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTTCATATCAGGATTATC
AATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCC
ATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTA
TTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAA
TCCGGTGAGAATGGCAAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATT
ACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCAATTCGTGATTGCGCCTGAG
CGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCG
GCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATAC
CTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGA
TAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCA
TCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGG
CTTCCCATAAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTATAC
CCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGA

ATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACC
AAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCG
CTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGG
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT
TCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCT
TACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCC
GCATAGTTAAGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCGA
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAA
ACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCT
GCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATA
AAGCGGGCCATGTTAAGGGCGTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGG
ATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTA
CTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACA ACTGGCGGTATGGATG
CGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAG
GTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGG
CGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTG
CTCAGGTGCGAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCCGGTGATTCA
TTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGA
TCATGCGCACCCGTGGGGCCCGCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTG
GTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGC
GACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCG
CTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTC
GAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
CGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTG
ATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCC

AGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGT
ATCGTTCGTATCCCCTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGC
GCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCA
TTCAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGC
TATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCG
AGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATG
CTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGT
CAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATC
CTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCA
CCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCAGCTGGCACCC
AGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGAC
TGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTT
GGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGT
GGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGAC
ATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCAT
GCCATAACGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATG
CGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCA
AGGAATGGTGCATG-3'

ASFV p72 表位的鉴定及初步应用中所合成的基因序列
表 A-1 基于全长 p72 的 13 个重叠肽 (p72-1-p72-13) 的基因序列

Table A-1 Gene sequence of 13 overlapping peptides (p72-1-p72-13) based on full-length p72

Polypeptide fragment	amino acid sequences (5' - 3')
p72 (1-13)	S1 MASGGAFCLIAN DGKADKIILA QDLLNSRISNIKNVN KSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHF
	S2 PTL SQIEETHLVHFNAHF KPYVPVGF EY NKVRPHTGT PTLGNKLTFGIPQYGDFHDMVGHHL
	S3 DFFHDMVGHHLGACHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQ LQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDP
	S4 NQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCE YPERLYENVRFDVNGNSLDEYSS
	S5 FDVNGNSLDEYSSDVTTLVRKFCIPGDKMTGYKHLV GQEVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTD
	S6 HDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPE NSHNIQTAGKQDITPITDATYLD
	S7 KQDITPITDATYLDIRRNVHYSCNGPQTPKYYQPPLA LWIKLRFWFNENVNLAIPSVSIPFGERF
	S8 LAIPSVSIPFGERFITIKLASQKDLVNEFPGLFVRQSRFI AGRPSRRNIRFKPWFIPGVI
	S9 RNIRFKPWFIPGVINEISLTNNELYNNLFVTPEIHNLF VKRVRFSLIRVHKTQVTHTNNNH
	S10 RVHKTQVTHTNNHHDEKLMSALKWPIEYMFIGLKP TWNISDQNP HQHRDWHKFGHVVN AIMQP
	S11 DWHKFGHVVN AIMQP THHAEISFQDRDTALPDACSSI SDISPVTYPITLPIIKNISVTAH
	S12 PITLPIIKNISVTAHGINLIDKFP SKFCSSYIPFHYGGNAI KTPDDPGAMMITFALKPREEYQPS
	S13 ITFALKPREEYQPSGHINVS RAREFYISWDTDYVGSIT TADLVVSASAINFLLLQNGSAVLRYSIT

表 A-2 基于 6 个肽段 (p72-2, p72-4, p72-5, p72-6, p72-45, p72-56) 截短短肽的基因序列

Table A-2 Gene sequence of truncated peptides based on 6 peptides (p72-2, p72-4, p72-5, p72-6, p72-45, p72-56)

Polypeptide fragment	amino acid sequences (5' - 3')		
p72-2 (1-9)	S14	PTLSQIEETHLVHFNAHFKP	
	S15	IEETHLVHFNAHFKPYVPVG	
	S16	LVHFNAHFKPYVPVGFYENK	
	S17	AHFKPYVPVGFYENKVRPHT	
	S18	YVPVGFYENKVRPHTGTPTL	
	S19	FEYKVRPHTGTPTLGNKLT	
	S20	VRPHTGTPTLGNKLTFGIPQ	
	S21	GTPTLGNKLTFGIPQYGDFF	
	S22	GNKLTFGIPQYGDFFHDMVGHHL	
	S23	NQTPLEGAVYTLVDPFGRPI	
	S24	EGAVYTLVDPFGRPIVPGTK	
	S25	TLVDPFGRPIVPGTKNAYRN	
p72-4 (1-9)	S26	FGRPIVPGTKNAYRNLYYYC	
	S27	VPGTKNAYRNLYYYCEYPGE	
	S28	NAYRNLYYYCEYPGERLYEN	
	S29	LYYYCEYPGERLYENVRFDV	
	S30	EYPGERLYENVRFDVNGNSL	
	S31	RLYENVRFDVNGNSLDEYSS	
	S32	FDVNGNSLDEYSSDVTTLVR	
	S33	NSLDEYSSDVTTLVRKFCIP	
	S34	YSSDVTTLVRKFCIPGDKMT	
	S35	TTLVRKFCIPGDKMTGYKHL	
	p72-5 (1-9)	S36	KFCIPGDKMTGYKHLVGQEV
		S37	GDKMTGYKHLVGQEVSVGT
S38		GYKHLVGQEVSVGTSGPLL	
S39		VGQEVSVGTSGPLLCNIHD	
S40		SVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTD	
S41		HDLHKPHQSK PILTDENDTQ	
S42		PHQSKPILTDENDTQRTCSH	
S43		PILTDENDTQ RTCSHTNPKF	
p72-6 (1-9)		S44	ENDTQRTCSHTNPKFLSQHF
		S45	RTCSHTNPKFLSQHFPENSH
		S46	TNPKFLSQHFPENSHNIQTA
		S47	LSQHFPENSHNIQTAGKQDI
	S48	PENSHNIQTAGKQDITPITD	
	S49	NIQTAGKQDITPITDATYLD	
	S50	FDVNGNSLDEY	
	p72-45 (1-5)	S51	VNGNSLDEYSS
		S52	GNSLDEYSS
		S53	VNGNSLDEY
		S54	SLDEY
		S55	HDLHKPHQSKPIL
p72-56 (1-5)	S56	LHKPHQSKPILTD	
	S57	PHQSKPIL	
	S58	LHKPHQSKP	
	S59	HQSKP	

表 A-3 基于 3 个肽段 (p72-2-45, p72-4-23, p72-5-7) 截短短肽的基因序列

Table A-3 Gene sequence of truncated peptides based on 3 peptides (p72-2-45, p72-4-23, p72-5-7)

Polypeptide fragment	amino acid sequences (5' - 3')	
p72-2-45 (1-6)	S60	PVGFYFNKVRPHT
	S61	GFEYNKVRPHT
	S62	EYNKVRPHT
	S63	NKVRPHT
	S64	YVPVGFYFNKVRP
	S65	YVPVGFYFNKV
p72-4-23 (1-6)	S66	VDPFGRPIVPGTK
	S67	PFGRPIVPGTK
	S68	GRPIVPGTK
	S69	TLVDPFGRPIVPG
	S70	TLVDPFGRPIV
	S71	TLVDPFGRP
	S72	GYKHLVGQEVSVETSG
	S73	GYKHLVGQEVSVEG
	S74	GYKHLVGQEV
	S75	GYKHLVGQ
p72-5-7 (1-10)	S76	GYKHL
	S77	HLVGQEVSVETSGPLL
	S78	GQEVSVETSGPLL
	S79	VSVETSGPLL
	S80	EGTSGPLL
	S81	SGPLL