

非洲猪瘟病毒 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性比较

施磊¹, 田占成¹, 杨吉飞¹, 高闪电¹, 独军政¹, 赵亚茹¹, 刘志杰¹, 关贵全¹, 刘光远¹, 罗建勋¹, 殷宏^{1,2}

1 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 甘肃兰州 730046

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

施磊, 田占成, 杨吉飞, 等. 非洲猪瘟病毒 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性比较. 生物工程学报, 2021, 37(1): 187-195.

Shi L, Tian ZC, Yang JF, et al. Comparison of the antigenicity of African swine fever virus p35 protein as diagnostic antigen. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 187-195.

摘要: 为了筛选出酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 反应性最佳的非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 诊断抗原, 通过建立 ELISA 方法, 以杆状病毒昆虫细胞表达系统表达的 ASFV p30 蛋白诊断抗原为参照, 首次探讨原核表达系统表达的 ASFV p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性和潜力。免疫印迹和免疫荧光结果表明, 获得了 40 kDa 的重组 p35 蛋白和 30 kDa 的 p30 蛋白, 两种蛋白与 ASFV 阳性血清均具有较好的免疫反应原性。采用重组 p30 和 p35 蛋白作为诊断抗原分别建立 ELISA 方法, 并验证其敏感性、稳定性以及与进口试剂盒的符合率。结果显示, 尽管 p35-ELISA 方法的检测敏感性稍低于 p30-ELISA 方法, 但其敏感性仍可达 95.8%, 且 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的批内和批间变异系数均小于 10%。p35-ELISA 方法与进口试剂盒比较, 符合率达 97.2%。结果表明建立的 p35-ELISA 方法敏感性高且稳定性好, 可应用于 ASFV 感染血清的检测。

关键词: 非洲猪瘟病毒, p35 蛋白, p30 蛋白, 抗原性, 间接 ELISA

Received: June 18, 2020; **Accepted:** November 2, 2020

Supported by: Key Research and Development Program of Gansu Province, China (No. 18YF1WA131), Agricultural Science and Technology Innovation Engineering Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI), Special Fund for Basic Scientific Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences (No. Y2019YJ07-02).

Corresponding authors: Zhancheng Tian. Tel: +86-931-8342681; E-mail: tianzhancheng@caas.cn

Hong Yin. E-mail: yinhong@caas.cn

甘肃省重点研发计划 (No. 18YF1WA131), 中国农业科学院农业科技创新工程项目 (No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI), 中国农业科学院基本科研业务费专项 (No. Y2019YJ07-02) 资助。

网络出版时间: 2020-11-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201119.1121.005.html>

Comparison of the antigenicity of African swine fever virus p35 protein as diagnostic antigen

Lei Shi¹, Zhancheng Tian¹, Jifei Yang¹, Shandian Gao¹, Junzheng Du¹, Yaru Zhao¹, Zhijie Liu¹, Guiquan Guan¹, Guangyuan Liu¹, Jianxun Luo¹, and Hong Yin^{1,2}

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: In order to screen African swine fever virus (ASFV) diagnostic antigen with the best enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reactivity. By establishing the ELISA method, the diagnostic antigen of ASFV p30 protein expressed by baculovirus-insect cell expression system as reference, we explored the antigenic properties and diagnostic potential of ASFV p35 protein expressed by prokaryotic expression system as a diagnostic antigen. The results of Western blotting and immunofluorescence show that the molecular weight of the recombinant p35 protein and p30 protein obtained was 40 kDa and 30 kDa, respectively, and these two proteins had good immuno-reactivity with ASFV positive serum. Recombinant p30 and p35 proteins were used as diagnostic antigens to establish ELISA, and the sensitivity and repeatability of these methods were tested. The results show that although the detection sensitivity of the p30-ELISA established in this study was higher than that of the p35-ELISA, the sensitivity of p35-ELISA was 95.8%, and variations in intra- and inter-assay repeatability of the two methods were less than 10%. The coincidence rate between the p35-ELISA and the imported kit was 97.2%. Results show that p35-ELISA was sensitive and stable, and could detect specific antibodies against ASFV.

Keywords: African swine fever virus, p35, p30, antigenicity, indirect ELISA

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种急性、高度接触性和高致死性动物传染病^[1]。ASFV 属于虫媒病毒, 是非洲猪瘟相关病毒科 (Asfarviridae) 非洲猪瘟病毒属 (*Asfivirus*) 的唯一成员^[2]。直径约为 200 nm 的病毒粒子呈二十面体形态, 具有内膜和囊膜双层膜结构, 病毒在胞浆内复制, 病毒基因组为线性、共价封闭的双链 DNA (dsDNA) 分子^[3-4]。非洲猪瘟被世界动物卫生组织 (OIE) 列为 A 类动物传染病。ASFV 主要感染家猪、非洲和欧亚野猪、钝缘蜚等, 其中被感染但不表现出临床症状的疣猪等非洲野猪和钝缘蜚为 ASFV 的宿主^[5-7]。ASF 的临床症状可表现为急性死亡、慢性和亚临床感染^[2,8-9]。自 2018 年 8 月我国辽宁省沈阳市发生首起 ASF 疫情以来^[10], ASF 给我国养猪业造成巨大损失, 严重影响了我国居民的生活质量。

尽管针对 ASF 开发了一些实验室内保护效果

较好的减毒疫苗, 但出于对 ASFV 减毒疫苗的生物安全性考虑, 到目前为止, 还没有被批准的商品化 ASF 疫苗用于田间 ASF 的免疫预防, ASF 的根除仍然需要依靠及时的实验室诊断和严格的扑杀措施来消除疫情和控制疾病^[11]。尽管分子诊断技术对于 ASF 的早期诊断预防很有效^[11-12], 但对于一些低病毒血症和临床症状不明显的感染动物开展大规模流行病学筛查, 血清学诊断方法仍然被认为是 ASF 诊断和控制的主要手段^[13-14]。目前 OIE 认可的 ASF 常规诊断方法为血清学 ELISA 方法初筛后再通过免疫印迹的方法进一步确定^[15-16]。OIE 认可的检测方法中的病毒抗原来源于活病毒, 涉及到生物安全三级实验室处理大量活病毒的生物安全性问题^[9,17]。因此, 筛选出一些 ELISA 反应性最佳的 ASFV 诊断抗原, 对于建立可靠的血清学诊断方法和避免不必要的生物安全问题至关重要^[18-19]。

以前的研究表明, 采用杆状病毒昆虫细胞表达系统制备的 ASFV pp62 重组蛋白作为诊断

抗原建立的 ELISA 方法,对保存较差的田间血清样品检测的可靠性和敏感性优于以 ASFV p30 和 p54 重组蛋白为包被抗原建立的 ELISA 方法,产生的 ELISA 结果甚至可以不用 OIE 认可的免疫印迹方法 (Immunoblotting, IB) 再次确认。尽管如此, pp62 蛋白具有诊断潜力的主要抗原表位的分布仍需作进一步分析^[18]。pp62 是一种由 ORF CP530R 编码的多聚蛋白前体,被 ASFV 蛋白酶 S273R 水解后形成两种结构蛋白 p35 和 p15^[20]。ASFV p35 蛋白上是否分布有 pp62 蛋白的主要线性抗原表位及作为诊断抗原建立 ELISA 方法尚未见报道。本研究首次以原核表达系统获得的 ASFV p35 重组蛋白为包被抗原建立 ELISA 方法,与通过昆虫杆状病毒表达系统制备的 p30 抗原建立的 ELISA 方法和进口试剂盒进行比较^[21],分析 ASFV p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性和潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

杆状病毒表达载体 pFastBacTM、pET-30a 载体、标准 ASFV 阳性血清和阴性血清均保存于国家非洲猪瘟区域 (兰州) 实验室。辣根过氧化物酶标记山羊抗猪 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Complete His-Tag Purification Resin 购自上海罗氏公司; INgezim PPA COMPAC 11.PPA.K.3 (5 plates kit, Lote/Batch:050819) 购自西班牙英吉纳公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自 Solarbio 公司。Cellfectin[®] II Reagent (昆虫细胞脂

质体转染试剂)、PureLinkTM HiPure Plasmid Midiprep Kit; Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

参照于 GenBank 中 ASFV (Pig/HLJ/18) 参考序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 p35 基因表达引物 (p35F 和 p35R)、p30 基因表达引物 (p30F 和引入 His 表达标签序列的 p30R) 和重组杆状病毒穿梭质粒鉴定引物 (M13F 和 M13R)。引物及基因合成与测序均委托擎科生物科技有限公司完成。

1.2.2 ASFV p35 重组蛋白和 ASFV p30 重组杆状病毒的制备

为了制备原核表达的 ASFV p35 重组蛋白。以合成的 p35 基因为模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 34 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增的目的基因经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后插入到 pET-30a 载体中,PCR 鉴定为阳性的菌液经擎科生物科技有限公司测序正确后,将其命名为 pET-30a-p35。将阳性重组质粒转化至 BL21 感受态细胞,经 16 °C 条件下诱导表达 6 h 后用 SDS-PAGE 检测蛋白表达量。大量诱导后沉淀菌体,用裂解液重悬菌体,超声破碎后离心,取上清按照 Ni-NTA Superflow Cartridge 手册在非变性条件下进行镍柱亲和层析纯化重组蛋白,纯化的重组蛋白经 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
p35F	GCGAATTCATGGGGAATGACCCGCCGGT	28
p35R	CTGTGACTTAATGGTGATGATCCCCCTACCTTTTCCT	39
p30F	GCGAATTCATGGATTTTATTTAAATA	27
p30R	TGTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGATGTTTTTTTTTTAAAAAGTTTAAT	59
M13F	TGTAACGACGGCCAGT	18
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	23

为了获得 ASFV p30 重组杆状病毒。以合成的带有 His 表达标签的 ASFV p30 基因为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 1 min, 48 °C 30 s,72 °C 1.5 min,34 个循环;72 °C 10 min。将目的 DNA 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后插入到 pFastBac™ 载体,得到 pFastBac-p30 重组质粒,委托擎科生物科技有限公司测序验证后,将 pFastBac-p30 重组质粒转化至 DH10Bac™ 感受态细胞,得到重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-p30,进一步用鉴定引物 M13F 和 M13R 鉴定。将鉴定正确的重组杆粒 DNA 提纯后在 Cellfectin® II Reagent 的介导下,转染生长状态最佳的 Sf9 细胞,设正常细胞作为对照。27 °C 培养 72 h,待出现明显细胞病变后,收获上清用蚀斑试验测定重组杆状病毒的效价。再次进行病毒传代扩增,获得病毒滴度较高的 P3 代 Bac-p30 重组杆状病毒。

1.2.3 ASFV p35 和 p30 重组蛋白的鉴定

用收集的 p3 代重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 昆虫细胞裂解上清和原核表达纯化的重组 p35 蛋白作为抗原。ASFV 阳性血清 (1:500) 作为一抗,并将阴性血清 (1:500) 设为阴性对照,山羊抗猪 IgG (1:20 000) 作为二抗进行免疫印迹分析,加入底物显色液后避光显色 3–10 min,拍照。

将 MOI 为 0.1 的 p3 代重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 细胞作为检测组,同时设杆状病毒感染的 Sf9 细胞作为空白对照组。用小鼠抗 His 标签抗体 (1:200) 作为一抗,Alexa Flour 488 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 000) 作为二抗进行间接免疫荧光分析,倒置荧光显微镜下观察特异性绿色荧光的产生情况。

1.3 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法的建立

1.3.1 反应条件的优化

按照常规间接 ELISA 的操作方法^[22],通过方阵滴定法对最佳抗原包被量、最佳血清稀释倍数和最佳封闭液及作用时间进行摸索与优化。将纯

化的重组 p35 蛋白以 5、2.5、1.25、0.625 μg/mL 进行 100 μL/孔的抗原量包被;同时将适量重组杆状病毒 Bac-p30 感染昆虫 Sf9 细胞 72 h 后收集的细胞裂解上清测定总蛋白浓度为 14.9 mg/mL,将获得的蛋白用 PBS 缓冲液以 1:10、1:50、1:100 和 1:200 稀释后按照 100 μL/孔的抗原量包被,将标准 ASFV 阴性和阳性血清做 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200 和 1:6 400 稀释。分别加入到 2%脱脂乳或 1% BSA 封闭的 ELISA 酶标板中,根据 ASFV 阴性和阳性血清的 OD_{450} 值及 P/N 值最大时选择合适的抗原包被量和最佳血清稀释倍数和封闭液。将 ASFV 阳性和阴性血清按最佳稀释度在 37 °C 分别孵育 0.5、1.0、1.5 h,根据阴性和阳性血清的 OD_{450} 值及 P/N 值选择合适的血清作用时间;将山羊抗猪 IgG (1:20 000) 加入 ELISA 板后,37 °C 分别作用 0.5、1.0、1.5 h,根据 P/N 值选择合适的酶标二抗作用浓度和作用时间。

1.3.2 临界值的确定

在重组蛋白 p30 和 p35 为诊断抗原建立的最佳 ELISA 反应条件下,通过实验室保存的 92 份田间非洲猪瘟阴性血清(经西班牙英吉纳公司的 ASFV 抗体检测试剂盒和 OIE 建议的 ASFV 荧光 PCR 检测均为阴性),以公式:临界值=阴性样品的平均 OD_{450} 值+3×标准偏差(s),确定临界值。当待检血清的 OD_{450} 平均值 $\geq \bar{x} + 3s$,则判定为阳性,当 $OD_{450} < \bar{x} + 2s$ 则判定为阴性,介于二者之间则判定为可疑样品。

1.4 敏感性检测

使用 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法对用同一批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的血清样品进行检测,从 1:100 起,2 倍比稀释至 1:6 400,统计不同稀释倍数下二者的阳性率,进行 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法检测灵敏度的比较。此外,用 p35-ELISA 方法对 48 份 ASFV 感染血清进行检测,计算其敏感性。

1.5 稳定性检测

按已建立的间接 ELISA 最佳反应体系和条件,用同一批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的标准 ASFV 阳性血清样品进行检测;用不同批次重组蛋白包被的酶标板对同一批次不同稀释倍数的标准 ASFV 阳性血清样品进行检测,计算批内和批间样本的变异系数 CV,评价批内和批间重复性试验的稳定性。

1.6 符合率试验

同时用本研究建立的 p35-ELISA 方法和西班牙英吉纳公司非洲猪瘟抗体检测试剂盒对 48 份 ASFV 感染血清和 60 份健康血清进行检测,计算二者符合率。

2 结果与分析

2.1 重组 p35 蛋白的表达纯化和鉴定

SDS-PAGE 结果显示,部分重组 p35 蛋白以可溶性的形式表达,通过非变性条件下的镍柱亲和层析纯化获得了纯度较高的重组 p35 蛋白,分子量约为 40 kDa (图 1A);与阴性血清对照组相

比,ASFV 阳性血清能够特异性识别纯化的重组 p35 蛋白 (图 1B)。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果表明 p35 蛋白在原核表达系统中得以正确表达。

2.2 重组 p30 蛋白的表达和鉴定

与正常 Sf9 细胞相比,p3 代重组杆状病毒 Bac-p30 感染 Sf9 细胞 72 h 后,显微镜下可观察到明显的细胞病变,主要表现为细胞生长缓慢,开始膨大变成囊泡状,裂解和脱落。间接免疫荧光结果表明:对照组杆状病毒感染的 Sf9 细胞无特异性荧光出现,但重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞在倒置荧光显微镜下出现特异性的绿色荧光 (图 2A)。免疫印迹结果显示,ASFV 阳性血清能够特异性识别重组杆状病毒 Bac-p30 感染的 Sf9 细胞裂解上清中的 p30 抗原条带 (图 2B)。

2.3 反应条件的优化

根据得到的 ASFV 阳性血清和阴性血清 OD_{450} 值及 P/N 值可以得出本研究所建立的 p35-ELISA 方法的最适抗原包被量为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,以 1% BSA 作为封闭液封闭,最适封闭时间为 45 min,

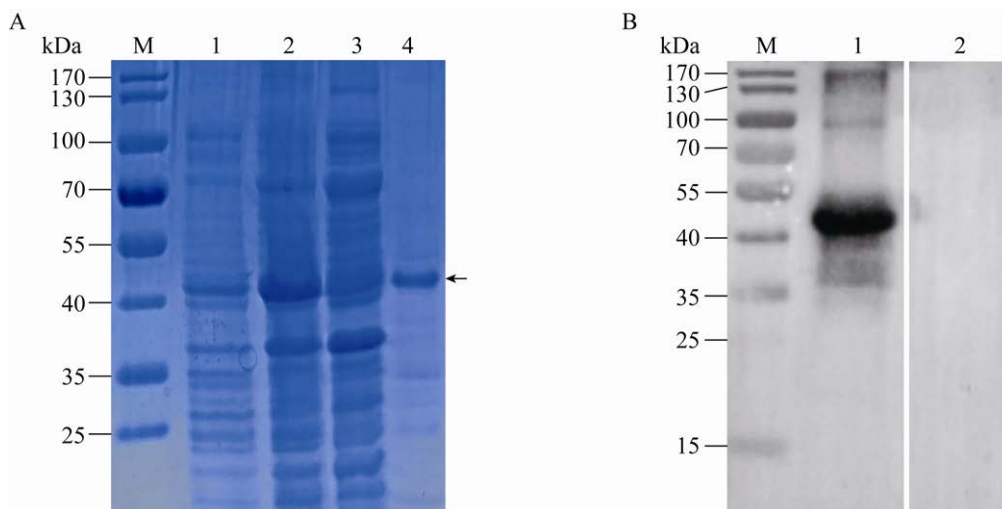


图 1 重组 p35 蛋白的表达鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant p35 protein. (A) SDS-PAGE of recombinant ASFV p35 protein. M: protein marker; 1: negative control; 2: induced lysates for 6 h; 3: ultrasonic supernatant of recombinant bacteria for 6 h; 4: the purified recombinant p35 protein. (B) The reactivity of anti-ASFV positive sera to the purified recombinant p35 protein, M: protein marker; 1, 2: the positive sera against ASFV antigen; 3: negative sera.

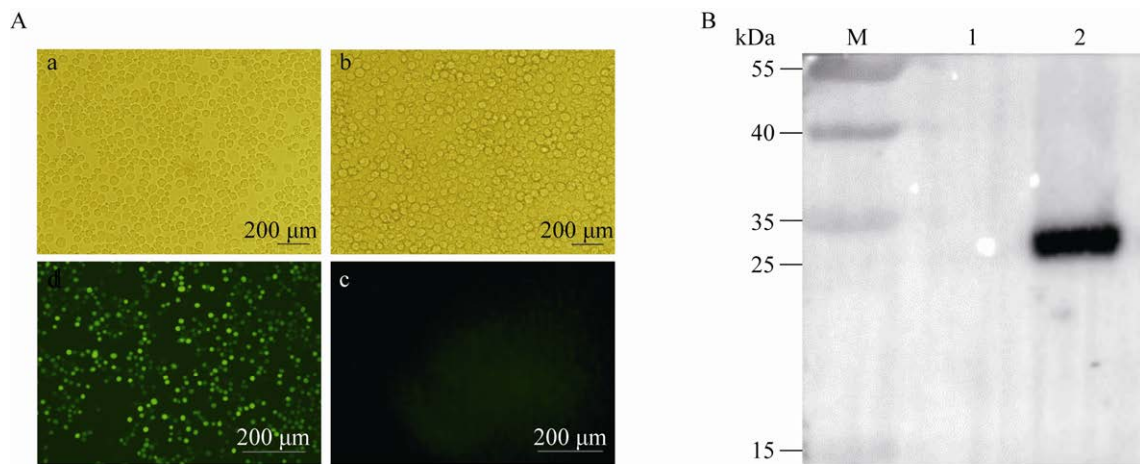


图 2 重组 p30 蛋白的表达鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant p30 protein by Western blotting. (A) The cytopathic effect and indirect immunofluorescence assay of Sf9 cells infected with Bac-p30. (a) Normal Sf9 cells; (b) Sf9 cells infected with Bac-p30; (c) Sf9 cells infected with wild type baculovirus; (d) Sf9 cells infected with Bac-p30. (B) M: protein marker; 1: Sf9 cells infected with wild type baculovirus; 2: ultrasonic supernatant of Sf9 cells infected with Bac-p30.

血清稀释倍数为 1 : 100, 酶标二抗的稀释倍数为 1 : 20 000, 最适酶标二抗封闭时间为 45 min 效果最佳; 将重组杆状病毒 Bac-p30 感染昆虫 Sf9 细胞获得的细胞裂解上清蛋白总浓度为 14.9 mg/mL 以 1 : 200 稀释后 100 μ L/孔的抗原量包被, 1% BSA 作为封闭液封闭, 最适封闭时间为 1 h, 血清稀释倍数为 1 : 100, 酶标二抗的稀释倍数为 1 : 20 000, 最适酶标二抗封闭时间为 1 h, 产生的 P/N 值最大, 效果最佳。

2.4 临界值确定和敏感性检测

以建立的 p35-ELISA 方法对 92 份 ASFV 阴性血清样品进行检测, 平均 OD_{450} 值为 0.163 6, 标准差为 0.017 8, 确定的临界值为 0.217, 当待检血清 OD_{450} 值 \geq 0.217 判定为阳性, 当 OD_{450} 值 $<$ 0.199 判定为阴性; p30-ELISA 方法对同一批次 ASFV 阴性血清样品进行检测, 平均 OD_{450} 值为 0.160 3, 标准差为 0.030 8, 按照公式计算其临界值为 0.253, 当待检血清 OD_{450} 值 \geq 0.253 判定为阳性, 当 OD_{450} 值 $<$ 0.222 判定为阴性。

通过 ASFV 阳性血清倍比稀释的方法比较 p30-ELISA 方法和 p35-ELISA 方法的检测灵敏度。结果表明, p30-ELISA 方法的检测敏感性稍高于 p35-ELISA 方法 (数据未显示)。在被检的 48 份 ASFV 感染血清中, p35-ELISA 方法有 46 份血清检测结果为阳性, 该方法的敏感性为 95.8%。

2.5 稳定性评价

p35-ELISA 方法的批内变异系数在 1.42%–7.40% 之间, 批间变异系数在 0.58%–1.71% 之间 (表 2)。p30-ELISA 方法的批内变异系数在 0.39%–3.39% 之间, 批间变异系数在 0.87%–3.58% 之间 (表 3)。

2.6 符合率试验

对 108 份血清 (48 份 ASFV 感染猪血清和 60 份健康猪血清) 进行检测, 结果显示, 本研究建立的 p35-ELISA 抗体检测方法和西班牙英吉纳公司非洲猪瘟抗体检测试剂盒 (ING) 共有 105 份血清检测结果一致, 符合率为 97.2%。

表 2 p35-ELISA 的稳定性试验

Table 2 Stability test of the p35 -ELISA

Dilution ratio	p35 In-batch			p35 Batch-to-batch		
	Average value	Standard deviation	CV (%)	Average value	Standard deviation	CV (%)
1 : 100	1.725 6	0.024 5	1.42	1.725 6	0.024 5	1.42
1 : 200	0.882 0	0.017 9	2.03	0.882 0	0.017 9	2.03
1 : 400	0.634 0	0.022 3	3.52	0.634 0	0.022 3	3.52
1 : 800	0.435 3	0.032 2	7.40	0.435 3	0.032 2	7.40
1 : 1 600	0.267 0	0.005 0	1.87	0.267 0	0.005 0	1.87

表 3 p30-ELISA 的稳定性试验

Table 3 Stability test of the p30-ELISA

Dilution ratio	p30 In-batch			p30 Batch-to-batch		
	Average value	Standard deviation	CV (%)	Average value	Standard deviation	CV (%)
1 : 100	1.320 6	0.031 8	2.41	1.288 8	0.011 7	0.91
1 : 200	1.201 4	0.010 4	0.87	1.191 0	0.005 1	0.43
1 : 400	1.070 6	0.038 3	3.58	1.032 3	0.035 0	3.39
1 : 800	0.935 0	0.030 1	3.22	0.904 9	0.028 1	3.11
1 : 1 600	0.827 1	0.009 7	1.17	0.817 4	0.003 2	0.39

表 4 p35-ELISA 与进口试剂盒符合率试验

Table 4 Coincidence rate test of p35-ELISA with imported kit

p35-ELISA	ING		Total
	Positive	Negative	
Positive	45	1	46
Negative	2	60	62
Total	47	61	108

3 讨论

非洲猪瘟给我国乃至全球养猪业带来了毁灭性的打击^[10]。在国际上还没有研发出针对 ASF 有效的疫苗和治疗方法之前,分子诊断方法和血清学检测技术仍被认为是识别感染动物、根除潜在 ASFV 感染风险的主要手段^[11,23]。尽管分子诊断方法对于 ASF 的早期诊断预防至关重要,但血清学方法成本低廉和便捷的特点更适合于大规模的田间流行病学调查^[13,17,23]。可靠的血清学诊断方法的建立与所选抗原的抗原性密切相关^[19,21]。以前的研究表明,在昆虫杆状病毒表达系统中

制备的 ASFV 诊断抗原中,ASFV pp62 蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 方法针对保存较差的田间血清样品的检测结果优于以 p54 和 p30 蛋白为抗原靶标建立的 ELISA 方法^[19]。为了进一步确认 pp62 蛋白水解产物 p35 蛋白作为诊断抗原的抗原性和潜力,本研究采用原核表达系统表达了 p35 蛋白和昆虫杆状病毒表达系统表达 p30 蛋白,以上述方法制备的抗原建立的 ELISA 诊断方法进行检测灵敏度的比较,获得了与预期理论蛋白分子量大小一致的 40 kDa 重组 p35 蛋白和 30 kDa 重组 p30 蛋白。制备的诊断抗原能与 ASFV 阳性血清发生特异性反应,获得的 p30 蛋白和 p35 蛋白均具有较好的反应原性。在确定的最佳 ELISA 反应体系和条件下,确定了 p30-ELISA 和 p35-ELISA 方法的临界值、检测灵敏度和批内和批间重复性试验的稳定性评价。

原核表达系统制备诊断抗原的生产成本相对较低廉,制备的蛋白易于纯化,稳定性较好,适合大规模生产^[24]。本研究在原核表达系统中制备

ASFV p35 重组蛋白,通过与昆虫杆状病毒表达系统表达的 p30 重组蛋白在抗原性及其 ELISA 中的反应性进行对比分析。以原核表达纯化的 p35 抗原为基础建立的间接 ELISA 方法的检测灵敏度稍低于以昆虫杆状病毒表达系统制备的 p30 抗原为基础建立的间接 ELISA 方法。昆虫杆状病毒表达系统高效表达重组蛋白的同时能够正确折叠以维持表达蛋白的空间构象和蛋白活性,而原核表达系统表达的蛋白仅展示线性表位。因此,与原核表达的 p35 蛋白相比,昆虫杆状病毒表达系统表达的 p30 蛋白可展示较多的线性和构象性表位,这可能解释昆虫杆状病毒表达系统表达制备的 p30 重组蛋白作为诊断抗原时,p30-ELISA 方法的灵敏度稍高于原核表达系统制备的重组 p35 蛋白为包被抗原建立的 ELISA 方法。因此,在后续的研究中可将 ASFV p35 蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中表达,获得具有生物学活性的 p35 重组蛋白,以便于该重组蛋白展示更多抗原表位用于提高重组 p35 蛋白诊断抗原的抗原性和检测灵敏度。尽管如此,建立的 p35-ELISA 方法与进口试剂盒相比,其符合率达到 97.9%,可见,所建立的 p35-ELISA 方法可用于田间 ASFV 抗体特异性检测。

总之,本研究中的原核表达系统制备的 p35 蛋白和昆虫杆状病毒表达系统制备的 p30 蛋白的反应原性较好,建立的 p35-ELISA 方法和 p30-ELISA 方法检测灵敏度高且稳定性好,两种方法均可用于田间 ASF 血清样本的流行病学调查。该研究为建立 ASF 血清学诊断方法制备优质诊断抗原提供了新的思路和物质基础。

REFERENCES

- [1] Penrith ML, Thomson GR, Bastos ADS, et al. An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Rev Sci Technol*, 2004, 23(3): 965-977.
- [2] Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, et al. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 2013, 173(1): 3-14.
- [3] 张洪亮, 金铭, 赵越, 等. 非洲猪瘟病毒免疫学及疫苗研究进展. *病毒学报*, 2019, 35(3): 533-541. Zhang HL, Jin M, Zhao Y, et al. Research progress in the immunology and vaccine of the African swine fever virus. *Chin J Virol*, 2019, 35(3): 533-541 (in Chinese).
- [4] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt JA. African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Adv Virus Res*, 2018, 100: 41-74.
- [5] Blome S, Gabriel C, Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar-. *Virus Res*, 2013, 173(1): 122-130.
- [6] Mebus CA. African swine fever. *Adv Virus Res*, 1988, 35: 251-269.
- [7] 王述超, 张守峰, 扈荣良. 非洲猪瘟流行病学与媒介钝蜱研究进展. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2019, 26(4): 269-276. Wang SC, Zhang SF, Hu RL. Research progress of *Ornithodoros* ticks related to the epidemiology of African swine fever virus. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2019, 26(4): 269-276 (in Chinese).
- [8] Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B. African swine fever (ASF): Five years around Europe. *Vet Microbiol*, 2013, 165(1/2): 45-50.
- [9] Dixon LK, Sun H, Roberts H. African swine fever. *Antiviral Res*, 2019, 165: 34-41.
- [10] 王颖, 缪发明, 陈腾, 等. 中国首例非洲猪瘟诊断研究. *病毒学报*, 2018, 34(6): 817-821. Wang Y, Miao FM, Chen T, et al. Diagnosis of the first African swine fever in China. *Chin J Virol*, 2018, 34(6): 817-821 (in Chinese).
- [11] Arias M, Jurado C, Gallardo C, et al. Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(S1): 235-247.
- [12] Gallardo MC, Reoyo ADLT, Fernández-Pinero J, et al. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag*, 2015, 1: 21.
- [13] Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res*, 2019, 271: 197676.

- [14] Laddomada A, Rolesu S, Loi F, et al. Surveillance and control of African swine fever in free-ranging pigs in Sardinia. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(3): 1114-1119.
- [15] Pastor MJ, Laviada MD, Sanchez-Vizcaino JM, et al. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can J Vet Res*, 1989, 53(1): 105-107.
- [16] Pastor MJ, Arias M, Escribano JM. Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res*, 1990, 51(10): 1540-1543.
- [17] Gallardo C, Nieto R, Soler A, et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in eastern European union countries: how to improve surveillance and control programs. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(8): 2555-2565.
- [18] Gallardo C, Blanco E, Rodriguez JM, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of african swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(3): 950-956.
- [19] Gallardo C, Reis AL, Kalema-Zikusoka G, et al. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(7): 1012-1020.
- [20] Simón-Mateo C, Andrés G, Almazán F, et al. Proteolytic processing in African swine fever virus: Evidence for a new structural polyprotein, pp62. *J Virol*, 1997, 71(8): 5799-5804.
- [21] Pérez-Filgueira DM, González-Camacho F, Gallardo C, et al. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3114-3121.
- [22] 仇薇, 侯力丹, 宋洁, 等. 一种更灵敏的特异性检测 H9 亚型禽流感抗体的间接 ELISA 方法的建立. *生物工程学报*, 2017, 33(8): 1253-1264.
Zhang W, Hou LD, Song J, et al. Establishment of a high sensitive indirect ELISA for detecting specific antibodies against H9 subtype avian influenza virus. *Chin J Biotech*, 2017, 33(8): 1253-1264 (in Chinese).
- [23] Zsak L, Borca MV, Risatti GR, et al. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 112-119.
- [24] Porowińska D, Wujak M, Roszek K, et al. Prokaryotic expression systems. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013, 67: 119-129.

(本文责编 陈宏宇)