

陈艳, 祝贺, 童明龙, 等. 非洲猪瘟病毒 CD2v 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 86-93.

CHEN Y, ZHU H, TONG M L, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against African swine fever virus protein CD2v [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 86-93.

非洲猪瘟病毒 CD2v 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

陈艳¹, 祝贺², 童明龙³, 陆冠亚², 茹小桐², 姜焱², 周斌^{1*}, 龙云凤^{2*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 南京海关动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210019;

3. 苏州海关综合技术中心, 江苏 苏州 215104)

摘要: 本研究以原核系统表达的非洲猪瘟病毒 CD2v 膜内区重组蛋白为免疫原接种 BALB/c 小鼠, 经过细胞融合、间接 ELISA 筛选和多次亚克隆获得了 8 株能够稳定分泌 CD2v 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为 RH1、RH3、RH4、RH5、RH6、RH8、RH9 和 RH10。8 株单克隆抗体的轻链类型均为 Kappa 型, 其中 RH1、RH5、RH9 这 3 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG2b, 其余 5 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG1。Western blot 和免疫荧光试验证明获得的单克隆抗体具有良好的反应性, 能特异地识别昆虫杆状病毒表达系统重组表达的 CD2v 蛋白, 可为非洲猪瘟病毒结构蛋白的功能解析以及血清学诊断方法的开发提供重要的生物学材料。

关键词: 非洲猪瘟病毒; CD2v 蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)03-0086-08

Development and characterization of monoclonal antibodies against African swine fever virus protein CD2v

CHEN Yan¹, ZHU He², TONG Minglong³, LU Guanya², RU Xiaotong², JIANG Yan²,
ZHOU Bin^{1*}, LONG Yunfeng^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Animal, Plant and Food Inspection Center, Nanjing Customs, Nanjing 210019, China;

3. Technology Center of Suzhou Customs District, Suzhou 215104, China)

Abstract: In this study, eight hybridoma cell lines which were capable of stably secreting monoclonal antibodies against CD2v protein, named RH1, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8, RH9 and RH10, were obtained by inoculating BALB/c mice with the prokaryotic recombinant CD2v intramembrane region protein of African swine fever virus, and followed by cell fusion, indirect ELISA screening and multiple subcloning. The light chain type of the eight monoclonal antibodies was Kappa type. Three of the monoclonal antibodies, RH1, RH5 and RH9, were of IgG2b heavy chain subtype and the remaining five monoclonal antibodies were of IgG1 heavy chain subtype. The eight monoclonal antibodies showed good reactivity and specifically recognized the recombinant CD2v protein expressed by the insect baculovirus system, which might be important biological material for the functional elucidation of ASFV structural proteins and the development of serological diagnostic methods.

Keywords: ASFV; CD2v protein; monoclonal antibody

非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染所引发的非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是猪的一种具有高度传播性的急性、热性、出血性传

染病, 强毒株致死率可达到 100%, 临床症状主要表现为高烧、严重抑郁、厌食、皮肤发绀和全身组织器官的出血性病变^[1]。世界动物卫生组织 (WOAH) 将 ASF 列为法定报告动物疫病, 我国也将之归入必须重点防范的一类动物疫病名录。2018 年 8 月, ASFV 首次传播到我国, 揭开了 ASF 在亚洲的首次暴发和持续流行的序幕^[2-3]。据 WOAH 统计, 自 2021 年 1 月至 2023 年 3 月, 全球仍有 41 个国家报告发生 ASF。ASFV 虽然不会危害人类健康, 但病毒的高致病性、对环境的强抵抗力和跨境传播能力给全球的养

收稿日期: 2023-05-29; 修回日期: 2023-12-19

基金项目: 南京海关科技计划项目 (2021KJ05)

第一作者: 陈艳, 女, 硕士

* 通信作者: 周斌, 教授, 研究方向: 动物分子病毒学与免疫学、

动物疫病诊断与防控, E-mail: zhoubin@njau.edu.cn; 龙云凤, 高级

兽医师, 研究方向: 进出境动物检疫技术研究, E-mail: 415520515

@qq.com。

猪业带来了破坏性影响和巨大的经济损失^[4]。近期, ASFV 疫苗的研发和临床应用推广取得了一定进展^[5], 但 ASF 的防治和净化策略仍侧重于生物安全措施, 提升猪群自身免疫力, 全面监测与精准清除^[6-7]。

ASFV 是一种双链的核质大 DNA 病毒, 基因组长度约为 170~190 kb, 编码 68 种结构蛋白和超过 100 种非结构蛋白^[8]。其中由 EP402R 基因编码的 CD2v 蛋白在病毒复制晚期表达, 呈高度糖基化, 参与 ASFV 感染的多个阶段^[9-11]。作为 ASFV 囊膜的主要组分和标识物, CD2v 蛋白具有良好的免疫原性, 可刺激产生 ASFV 特异性抗体并诱导细胞免疫应答, 是候选亚单位疫苗抗原之一^[12]。CD2v 也是 ASFV 的关键毒力因子, 能引起患猪的血细胞吸附, 常作为减毒活疫苗的基因敲除靶标^[13-14]。本研究将国内流行毒株 ASFV Pig/HLJ/2018 的 CD2v 膜内区基因序列插入到 pET-28a (+) 载体, 通过原核表达系统获得重组 CD2v 蛋白, 并利用杂交瘤技术制备出 8 株针对 CD2v 蛋白的单克隆抗体, 为 ASFV 诊断方法开发及病原学基础研究提供了生物学工具。

1 材料与方法

1.1 主要材料

原核表达载体 pET-28a (+)、重组质粒 pET-32a-CD2v、小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 由本实验室保存。ASFV 阳性血清标准品购自中国兽医微生物菌种保藏中心。P3 代 CD2v 重组杆状病毒、草地贪夜蛾蛹卵巢细胞 (Sf9) 由南京海关动植物与食品检测中心保存。BALB/c 小鼠购自江苏华创信诺医药科技有限公司。

高保真 PCR 聚合酶 Prime STAR、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、DNA Ladder、T4 DNA 连接酶和 DNA 胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。感受态细胞 DH5 α 和 BL21 (DE3) 购自北京擎科生物科技股份有限公司。HisTrap HP 预装式层析柱购自 General Electric 公司。250 kDa 预染 protein Marker、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒、考马斯亮蓝染色液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自上海雅酶生物医药科技有限公司。Green Taq Mix、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒购自南京诺唯赞医疗科技有限公司。聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 购自 Merck 公司。HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、鼠源 His 单克隆抗体、小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自 Proteintech 公司。TMB 底物和终止液购自碧云天生物技术有限公司。RPMI-1640

培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HAT 和 HT 培养基购自 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组质粒的构建与鉴定

根据 TMHMM-2.0 蛋白质跨膜区预测工具的分析结果, 针对 ASFV Pig/HLJ/2018 (GenBank: MK333180) 分离株 CD2v 蛋白膜内区 (688~1 083 bp, 230~360 aa) 设计常规 PCR 引物, F: 5'-TGACGGATCCTCTTTACGAAAAAGAAAAAAC-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点), R: 5'-TGACCTC-GAGAATAATTCTATCTACGTGAAT-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点), 扩增产物长度为 396 bp。以携带 CD2v 全长基因序列的重组质粒 pET-32a-CD2v 为 PCR 模板。反应体系为: Prime STAR 25 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。通过胶回收方法纯化 PCR 产物。

将经过限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 处理后的目的片段和 pET-28a (+) 载体用 T4 连接酶连接 8 h。之后转化连接产物到感受态细胞 DH5 α 中, 从菌液 PCR 鉴定为阳性的单克隆过夜培养物中提取质粒, 对重组质粒进行限制性双酶切, 阳性质粒由北京擎科生物科技股份有限公司测序。测序正确的重组质粒被命名为 pET-28a-CD2v-intra 并保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.3 重组 CD2v 蛋白的原核表达、纯化及反应原性鉴定

将重组质粒 pET-28a-CD2v-intra 转化到感受态细胞 BL21 (DE3) 中, 得到 CD2v 重组蛋白原核表达菌株 CD2v-intra-pET-28a-BL21。将 CD2v-intra-pET-28a-BL21 的过夜培养物按 1:100 体积比接种到含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养至对数生长期, 即菌液 OD₆₀₀ 范围应为 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 5~7 h 后离心收集菌体。用 PBS 重悬菌体后在冰浴条件下进行超声破碎, 之后在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 10 min。转移上清液到新的离心管, 并用 PBS 重悬沉淀, 分别制备 SDS-PAGE 样品, 用以鉴定重组蛋白的表达形式。

使用 His-tag 镍离子亲和层析法纯化重组蛋白。在预试验中用梯度咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱, 经 SDS-PAGE 测定重组蛋白的最佳洗脱浓度。后续洗脱时先用低咪唑浓度的除去杂蛋白, 再用最佳浓度的缓冲液洗脱下重组蛋白。用 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的纯度。用透析法对纯化后的重组蛋白做脱盐和浓缩处理。用 BCA 法测定重组蛋白的浓度。通过

Western blot 鉴定重组蛋白与 His 单克隆抗体、ASFV 阳性血清标准品的反应性。

1.4 CD2v 蛋白单克隆抗体制备

1.4.1 动物免疫

将 10 只 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠平均分为免疫组和阴性对照组并编号。首次免疫时，以背部皮下多点注射方式给免疫组每只小鼠接种 50 μg 重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂的乳化物。首次免疫后的第 3 周进行第 2 次免疫，第 4 周进行第 3 次免疫。第 2、3 次免疫时将弗氏完全佐剂换成弗氏不完全佐剂。整个免疫程序中，阴性对照组用等体积灭菌 PBS 处理。第 3 次免疫后 7 d，采集小鼠眼眶血，通过间接 ELISA 测定小鼠血清效价。细胞融合前 3 d，在效价达到 1 : 10 000 的小鼠中选择数值最高的 1 只，腹腔注射 100 μg 重组蛋白。

1.4.2 单克隆抗体的制备

细胞融合前 1 d，分离小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞，密度调整到 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ，按 100 μL 每孔加入到 96 孔板中培养。处死经过 4 次免疫的小鼠，分离脾细胞，在 PEG4000 作用下与对数生长期的 SP2/0 细胞按照 5 : 1 的比例进行细胞融合。将融合细胞用含 $1 \times \text{HAT}$ 和 20% FBS 的选择培养基重悬，加入到含有饲养细胞的 96 孔细胞板中培养。细胞融合 3 d 后，每日观察细胞状态并统计融合率。细胞融合第 5 天后，每隔 3 d 用 HAT 选择培养基半换液。细胞融合第 14 天后，用 HT 补充培养基半换液，取出的一半细胞培养上清液用间接 ELISA 方法测抗体水平，对阳性杂交瘤细胞至少进行 2~3 次亚克隆至抗体阳性率达 100%，确立杂交瘤细胞系并建库冻存，之后培养不再添加 HT 补充培养基。将阳性杂交瘤细胞连续传代培养和冻存，逐代减少 FBS 含量至 10%、5% 甚至无血清，以利于抗体产生和后续抗体纯化。测定不同代次的细胞培养物上清液中抗体效价，扩大培养能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株，于液氮中长期冻存。

1.4.3 间接 ELISA 方法

用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH=9.6) 作为包被液将重组蛋白 CD2v 稀释到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。之后用 PBST 洗涤 4 次，最后 1 次洗涤完将酶标板在吸水纸上拍干。用 5% 脱脂乳作为封闭液，按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按前述方法洗涤。将样品和对照，按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按前述方法洗涤。将 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体以 1 : 5 000 比例稀释后，按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按前述方法洗涤。按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 TMB 显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$

加入终止液。使用酶标仪读取 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值，待检样品 $OD_{450 \text{ nm}}/\text{阴性样品 } OD_{450 \text{ nm}}$ 值 (S/N) ≥ 2.1 时判定为阳性。选择 PBS 处理组的小鼠血清作为阴性对照，免疫组小鼠血清作为阳性对照。

1.4.4 腹水制备

准备 16 只 12 周龄 BALB/c 雌性小鼠，按 2 只/株单克隆抗体分组。给每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 经高压灭菌的液体石蜡。7 d 后给每只小鼠腹腔接种 5×10^5 个杂交瘤细胞。5~7 d 后，每日观察小鼠状态，对腹部明显膨大，触摸有波动感的小鼠用 0.55 mm 静脉采血针收集腹水。采集到的腹水在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜，次日 12 000 r/min 离心 5 min，收集中间层，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 CD2v 蛋白单克隆抗体的生物学特性鉴定

1.5.1 Western blot 鉴定单克隆抗体的反应性

贴壁培养 Sf9 细胞至对数生长期，按 $\text{MOI}=1$ 的剂量接种 P3 代 CD2v 重组杆状病毒，同时设置未感染的 Sf9 细胞作为空白对照，于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h。反复冻融 3 次使细胞破碎，取 100 μL 加入 25 μL 5 \times 蛋白上样缓冲液，混匀后煮沸 10 min，进行 SDS-PAGE 并转印到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂乳封闭膜，以杂交瘤细胞上清液作为一抗、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，浸入 ECL 发光液数秒后在成像系统中观察特异性条带。

1.5.2 免疫荧光试验 (IFA) 鉴定单克隆抗体的反应性

按 1×10^6 个细胞/孔的密度接种 Sf9 细胞至 48 孔板，培养至对数生长期。将 P3 代 CD2v 重组杆状病毒按 $\text{MOI}=1$ 的剂量感染细胞，同时设置未感染的 Sf9 细胞作为空白对照，于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h。用 4% 多聚甲醛固定细胞，加入 2% BSA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h，以杂交瘤上清液作为一抗、FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 各孵育 1 h，每个步骤之后用 PBS 洗涤 3 次。在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5.3 单克隆抗体的亚型鉴定

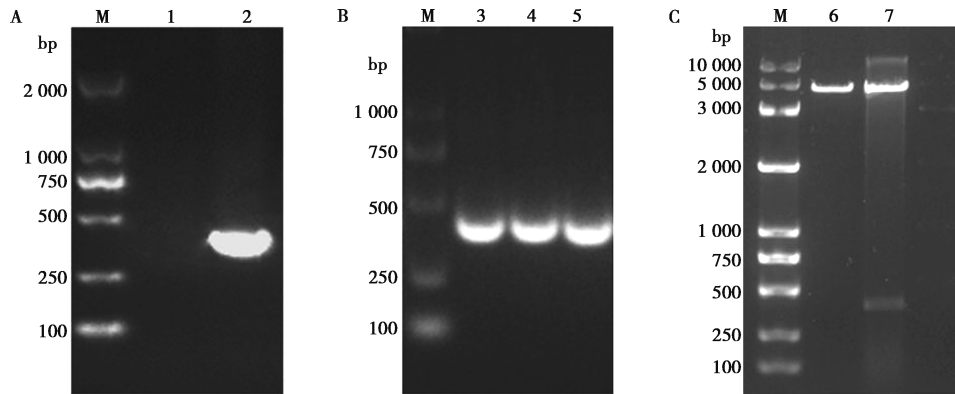
取建库的杂交瘤细胞上清液，使用小鼠抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体的亚型进行鉴定，具体操作按照说明书执行。

2 结果

2.1 重组质粒的构建与鉴定

ASFV Pig/H LJ/2018 (GenBank: MK333180) CD2v 蛋白膜内区基因 (688~1 083 bp, 230~360 aa) 的 PCR 扩增产物长度与预期的 396 bp 相符 (图 1A)。CD2v-intra-pET-28a-DH5 α 重组菌的菌液 PCR 鉴定均为阳性 (图 1B)。重组质粒 pET-28a-

CD2v-intra 经过双酶切鉴定后获得的片段与目的基因插入序列与目的基因完全一致。大小一致 (图 1C)。基因测序结果显示, 重组质粒的



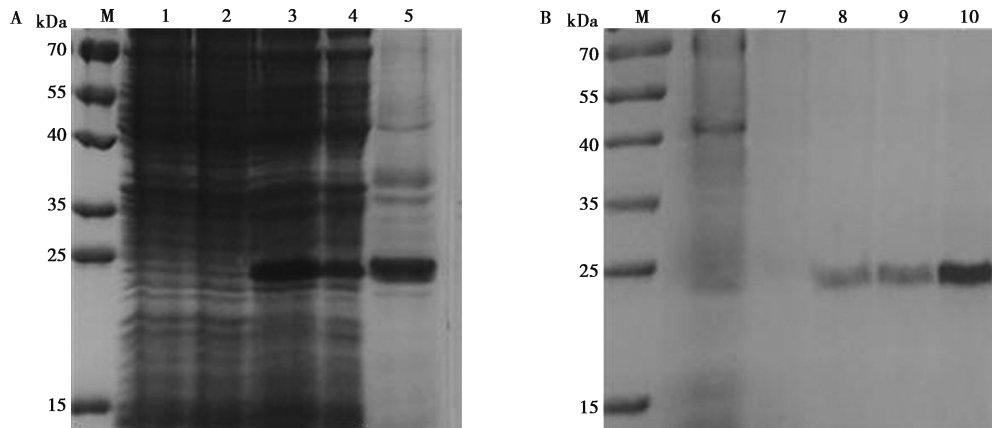
M. DNA Ladder; 1. 阴性对照; 2. CD2v 膜内区目的基因; 3~5. CD2v-intra-pET-28a-DH5 α 重组菌单克隆; 6. pET-28a 空载体; 7. 重组质粒 pET-28a-CD2v-intra。

图 1 CD2v 基因 PCR 扩增 (A)、重组菌菌液 PCR 鉴定 (B) 和重组质粒酶切鉴定 (C)

2.2 重组 CD2v 蛋白表达、纯化及鉴定

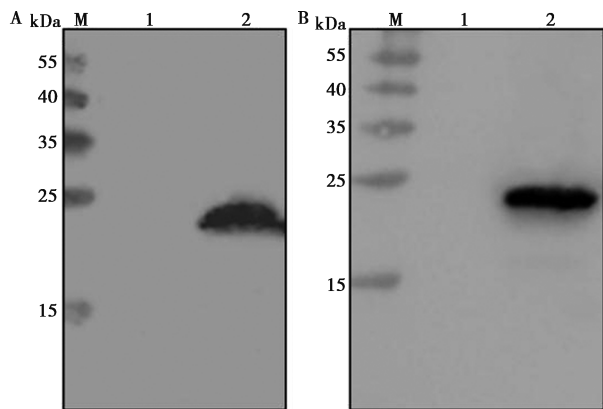
SDS-PAGE 结果显示, 重组菌株 CD2v-intra-pET-28a-BL21 经 IPTG 诱导后大量表达分子量约为 23 kDa 的融合蛋白, 与预期大小相符, 重组蛋白部分为可溶性表达, 部分为包涵体形式 (图 2A)。通过 His-tag 镍离子亲和层析法纯化的 CD2v 重组蛋白

在电泳后染色呈单一条带, 纯化效果良好 (图 2B)。Western blot 显示 His 单克隆抗体和 ASFV 阳性血清标准品均能特异性识别 CD2v 重组蛋白, 充分表明 CD2v 重组蛋白成功表达并且具有良好的反应原性 (图 3)。



M. 蛋白 Marker; 1. pET-28a-BL21 全菌; 2. 未诱导的 CD2v-intra-pET-28a-BL21; 3~5. 分别为诱导 CD2v-intra-pET-28a-BL21 裂解后全菌、上清液、沉淀; 6. 流穿液; 7~10. 分别为含 50、100、200、300 mmol/L 咪唑的洗脱液。

图 2 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白 CD2v 的原核表达 (A) 及纯化效果 (B)



M. 蛋白 Marker; 1. pET-28a-BL21 裂解物; 2. CD2v-intra-pET-28a-BL21 裂解物。

A. His 单克隆抗体为一抗; B. ASFV 阳性血清为一抗。

图 3 Western blot 鉴定重组蛋白 CD2v 的反应性

2.3 单克隆抗体的制备

在小鼠第 3 次免疫后采集眼眶血，按本研究建立的 ELISA 方法测定小鼠血清抗体效价，结果显示，免疫组小鼠的抗 CD2v 蛋白抗体效价均达到 1 : 10 000，可用于细胞融合。

按本研究建立的 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞，并通过有限稀释法进行 2~3 次亚克隆，最终获得 8 株分泌抗 CD2v 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，分别命名为 RH1、RH3、RH4、RH5、RH6、RH8、RH9、RH10。如表 1 所示，在经过连续传代培养和数次冻存后，杂交瘤细胞培养基上清液中的抗体效价仍维持在 1 : 12 800 的较高水平，表明其分泌抗体的能力稳定。本研究制备的腹水中 CD2v 抗体效价均达到 1 : 640 000，可为后续单克隆抗体的应用提供充足材料。

表 1 单克隆抗体效价测定

单克隆抗体	不同代次细胞培养上清液抗体效价					腹水抗体效价
	P0	P5	P10	P15	P20	
RH1	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 640 000
RH3	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH4	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH5	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH6	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH8	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH9	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 1 280 000
RH10	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 5 120 000

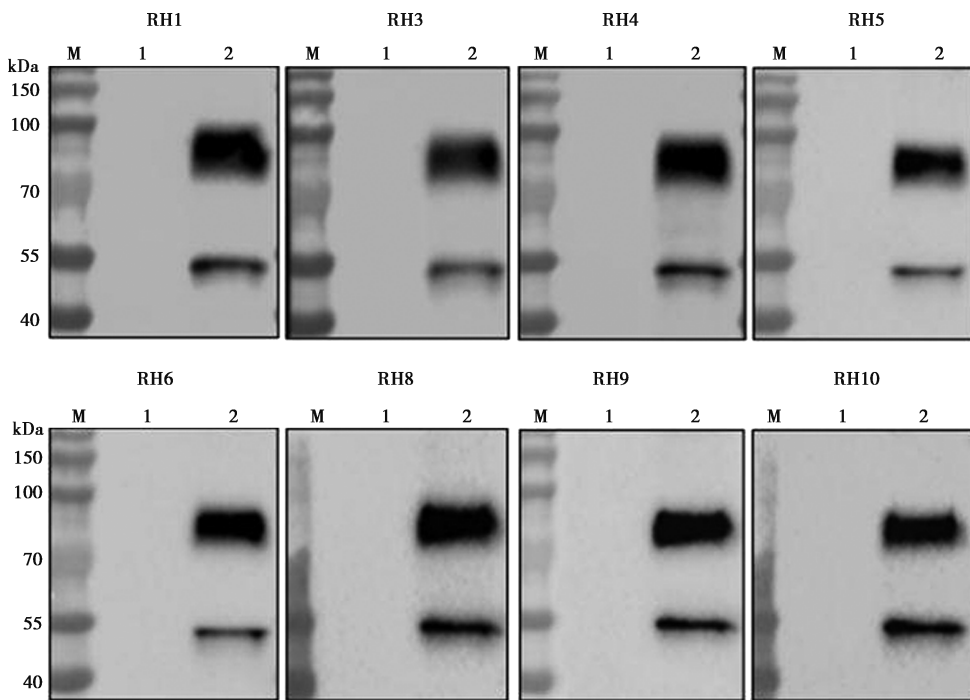
2.4 单克隆抗体的反应性鉴定

Western blot 结果如图 4 所示，8 株 CD2v 单克隆抗体均能识别昆虫杆状病毒系统表达的重组 CD2v 全长蛋白，曝光后出现的 2 条特异性条带，1 条为 44 kDa 左右的非糖基化 CD2v 蛋白，另 1 条为 85 kDa 左右的糖基化 CD2v 蛋白。IFA 试验中（图 5），His 标签抗体组产生的特异性绿色荧光表明感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞成功表达了 CD2v 全长蛋白，8 株 CD2v

单克隆抗体中有 6 株抗体能识别真核重组 CD2v 蛋白，分别是 RH1、RH4、RH5、RH6、RH9 和 RH10。单克隆抗体不与阴性对照发生反应。

2.5 单克隆抗体的亚型鉴定

由表 2 可见，8 株单克隆抗体的轻链类型均为 Kappa 型；RH1、RH5、RH9 这 3 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG2b，其余 5 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG1。



M. 蛋白 Marker; 1. S9 细胞; 2. 表达重组 CD2v 全长蛋白的 S9 细胞。

图 4 Western blot 鉴定 CD2v 蛋白单克隆抗体与真核重组 CD2v 蛋白的反应性

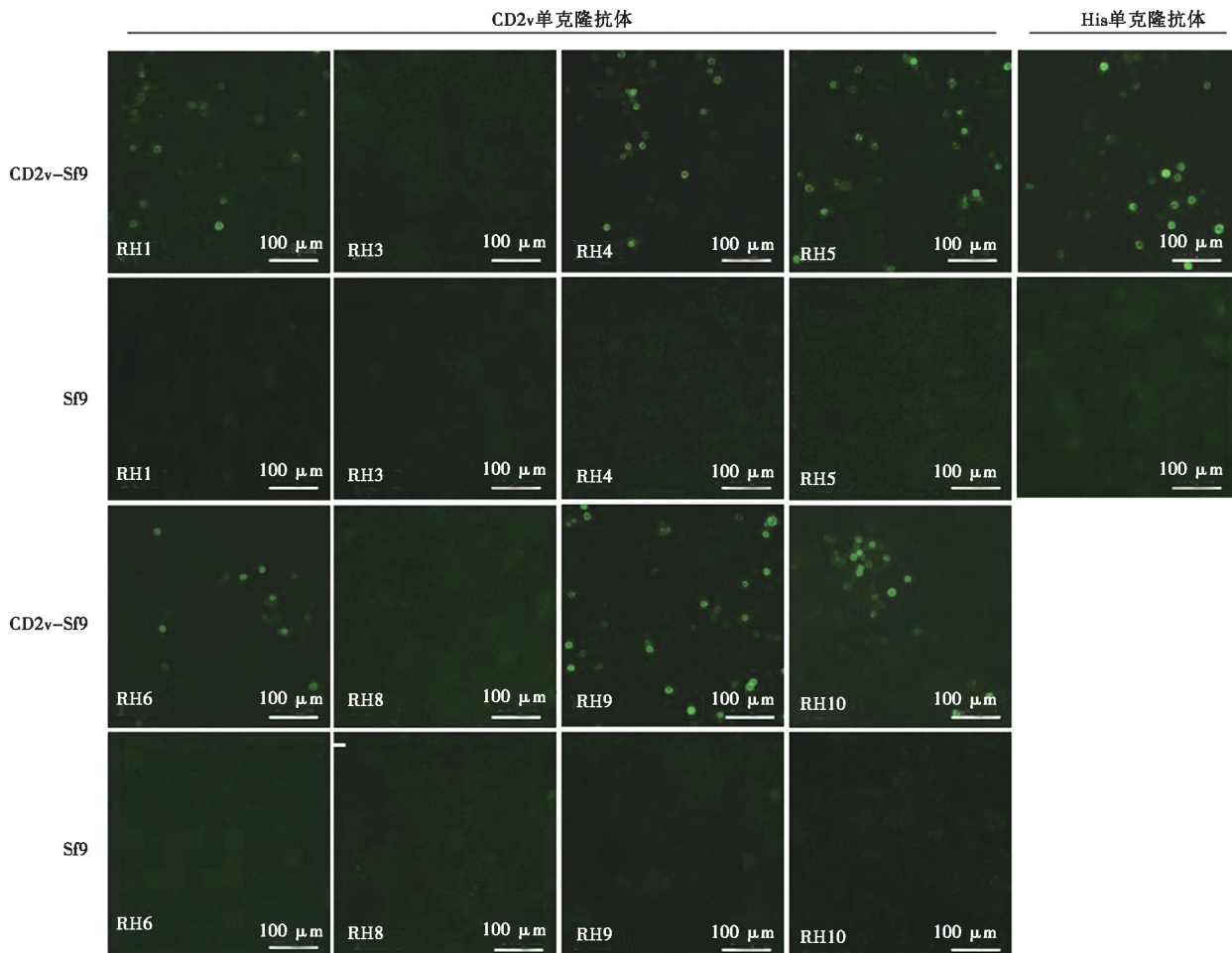


图 5 IFA 鉴定 CD2v 蛋白单克隆抗体与真核重组 CD2v 蛋白的反应性

表 2 CD2v 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体	重链亚类						轻链类型	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
RH1	0.10	0.14	1.61	0.10	0.07	0.14	1.43	0.09
RH3	1.12	0.08	0.11	0.11	0.13	0.12	1.55	0.09
RH4	1.24	0.08	0.15	0.13	0.10	0.10	1.05	0.14
RH5	0.12	0.11	1.22	0.06	0.06	0.13	1.78	0.07
RH6	1.56	0.07	0.12	0.06	0.10	0.11	1.09	0.13
RH8	1.37	0.10	0.14	0.07	0.15	0.11	1.17	0.07
RH9	0.13	0.06	1.48	0.06	0.10	0.12	1.67	0.07
RH10	1.07	0.13	0.09	0.11	0.08	0.10	1.73	0.15

3 讨论

自首次发现 ASFV 至今已有一个世纪, 尽管先前的研究工作较为全面地揭示了 ASFV 的病原学特征、传播机制和致病机制, 但仍存在很多未知和待解决的问题^[15]。未来的研究应继续深入探索 ASFV 与宿主之间的相互作用以及病毒的免疫逃避机制, 为 ASF 的防治提供更好的科学支持。ASFV 单克隆抗体的制备可以为上述研究提供有力的生物学工具。单克隆抗体是由单一 B 细胞克隆所产生, 能特异性识别单一抗原表位, 被广泛地应用于病原的基础研究和临床治疗与诊断, 如鉴定蛋白的表达与定位、靶向传递药物、阻断病原感染、富集和纯化生物制品、检测靶抗原等^[16]。Hagoss 等^[17]利用其制备的 7 株单克隆抗体鉴定出一个新的 ASFV CP312R 蛋白保守性抗原表位, 并通过激光共聚焦试验证实 CP312R 蛋白主要定位于细胞质中。Zhang 等^[18]则利用 ASFV p30 单克隆抗体开发了一种夹心胶体金试纸条, 适用于多种临床样本现场检测, 试纸条与荧光定量 PCR (qPCR) 的一致性为 95.42%, 检出限达 2.16 ng p30 蛋白。

囊膜蛋白 CD2v 在 ASFV 感染过程中发挥着重要作用。CD2v 蛋白介导了 ASFV 感染细胞周围红细胞的黏附与聚集, 促进病毒在体液中的扩散^[9]。通过其胞内 C 端结构域与肌动蛋白结合配体 SH3P7 结合, CD2v 蛋白可促进 ASFV 在宿主细胞内的复制和传播^[19]。CD2v 蛋白胞内 C 端结构域还靶向反式高尔基体网络 (TGN) 调节蛋白复合物 AP-1, 从而影响胞内物质转运, 在病毒感染细胞的免疫逃逸方面发挥潜在作用^[20]。通过激活 NF- κ B, CD2v 蛋白可诱导猪淋巴细胞和巨噬细胞中的 IFN 信号传导与凋亡^[21]。作为良好的免疫原, CD2v 蛋白能刺激机体产生特异性抗体, 是 ASFV 血清学诊断的主要标识物。针对 CD2v 蛋白的单克隆抗体不仅有助于深入研究靶抗原的生物学功能, 还对多种 ASFV 抗原抗体检测方法的

开发有着重要意义。CD2v 蛋白属于单次跨膜蛋白, 含有一段强疏水性的氨基酸序列。这种跨膜结构与信号肽结构相似, 原核细胞中简单的细胞器难以像真核细胞一样完成这类结构的识别及切除, 引导内质网、高尔基体重新包装及分泌这一复杂过程。因此, 本研究选择对国内流行毒株 ASFV Pig/Hlj/2018 的 CD2v 蛋白 C 末端膜内区 (688~1 083 bp, 230~360 aa) 进行原核表达。重组 CD2v 蛋白的相对分子量在 23 kDa 左右, 与预期相符, 诱导产物有约 50% 以可溶性形式表达。重组蛋白具有良好的抗原性, 可被 ASFV 阳性血清识别, 也可刺激小鼠产生高水平的血清抗体。经过细胞融合、杂交瘤细胞筛选和 2~3 次亚克隆, 本研究共制备出 8 株能稳定分泌 CD2v 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并收获了高抗体效价的腹水。Western blot 试验证实了 8 株 CD2v 蛋白单克隆抗体良好的反应性, 可识别糖基化 (约 85 kDa) 和非糖基化 (约 44 kDa) 的真核重组 CD2v 全长蛋白。其中 6 株抗体可通过 IFA 试验识别感染 CD2v 重组杆状病毒的 Sf9 细胞。8 株单克隆抗体的轻链类型均为 Kappa 型, RH1、RH5 和 RH9 这 3 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG2b, 其余 5 株单克隆抗体的重链亚型为 IgG1, 均适合用 protein A/G、分子筛层析和离子交换层析等常规抗体纯化方法^[16]。

本研究制备的 8 株 ASFV CD2v 蛋白膜内区单克隆抗体将有助于加速解析病毒蛋白的结构与功能, 探究病毒与宿主的相互作用和病毒的免疫逃避机制, 从而更高效地筛选出抗病毒药物, 更有针对性地开发疫苗。同时也为本研究后续完成靶抗原 B 细胞表位作图、中和抗体筛选以及建立高特异、高灵敏性的血清学诊断方法奠定了基础。

参考文献:

[1] PIKALO J, ZANI L, HüHR J, et al. Pathogenesis of African swine

- fever in domestic pigs and European wild boar – lessons learned from recent animal trials [J]. *Virus Res*, 2019, 271: 197614.
- [2] ZHOU X, LI N, LUO Y, et al. Emergence of African swine fever in China, 2018 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (6): 1482–1484.
- [3] DIXON L K, SUN H, ROBERTS H. African swine fever [J]. *Antiviral Research*, 2019, 165: 34–41.
- [4] ATA E B, LI Z J, SHI C W, et al. African swine fever virus: a raised global upsurge and a continuous threaten to pig husbandry [J]. *Microb Pathog*, 2022, 167: 105561.
- [5] TRAN X H, PHUONG L T T, HUY N Q, et al. Evaluation of the safety profile of the ASFV vaccine candidate ASFV-G- Δ H177L [J]. *Viruses*, 2022, 14 (5): 896.
- [6] 张涛, 李红, SANDRA B, 等. 非洲猪瘟的诊断和防治 [J]. *国外畜牧学 (猪与禽)*, 2022, 42 (4): 13–21.
- [7] 张洪亮, 金铭, 赵越, 等. 非洲猪瘟病毒免疫学及疫苗研究进展 [J]. *病毒学报*, 2019, 35 (3): 533–541.
- [8] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle [J]. *J Virol*. 2018, 92 (23): e01293–18. .
- [9] BORCA M V, KUTISH G F, AFONSO C L, et al. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption [J]. *Virology*, 1994, 199 (2): 463–468.
- [10] JIA N, OU Y, PEJSAK Z, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins *in viral* infection [J]. *J Vet Res*, 2017, 61 (2): 135–143.
- [11] LOPERA-MADRID J, OSORIO J E, HE Y, et al. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and modified vaccinia ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2017, 185: 20–33.
- [12] FENG Z, CHEN J, LIANG W, et al. The recombinant pseudorabies virus expressing African swine fever virus CD2v protein is safe and effective in mice [J]. *Virology*, 2020, 17 (1): 180.
- [13] WANG T, LUO R, SUN Y, et al. Current efforts towards safe and effective live attenuated vaccines against African swine fever: challenges and prospects [J]. *Infect Dis Poverty*, 2021, 10 (1): 137.
- [14] HEMMINK J D, KHAZALWA E M, ABKALLO H M, et al. Deletion of the CD2v gene from the genome of ASFV-Kenya-IX-1033 partially reduces virulence and induces protection in pigs [J]. *Viruses*, 2022, 14 (9): 1917.
- [15] WANG Y, KANG W, YANG W, et al. Structure of African swine fever virus and associated molecular mechanisms underlying infection and immunosuppression: a review [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 715582.
- [16] HOWARD G C, KASER M R. Making and using antibodies: a practical handbook [M]. 2th ed. New York: CRC Press, 2013: 421–426.
- [17] HAGOSS Y T, SHEN D, ZHANG Z, et al. Novel epitopes mapping of African swine fever virus CP312R protein using monoclonal antibodies [J]. *Viruses*, 2023, 15 (2): 557.
- [18] ZHANG X, LIU X, WU X, et al. A colloidal gold test strip assay for the detection of African swine fever virus based on two monoclonal antibodies against P30 [J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (3): 871–879.
- [19] KAY-JACKSON P C, GOATLEY L C, COX L, et al. The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7 [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt 1): 119–130.
- [20] PÉREZ-NÚÑEZ D, GARCÍA-URDIALES E, MARTÍNEZ-BONET M, et al. CD2v interacts with adaptor protein AP-1 during African swine fever infection [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0123714.
- [21] CHAULAGAIN S, DELHON G A, KHATIWADA S, et al. African swine fever virus CD2v protein induces β -interferon expression and apoptosis in swine peripheral blood mononuclear cells [J]. *Viruses*, 2021, 13 (8): 1480.