

陈艳, 龙云凤, 姜焱, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 蛋白单抗制备及 B 细胞线性抗原表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 115-122.

CHEN Y, LONG Y F, JIANG Y, et al. Development and B cell linear mapping of monoclonal antibodies against African swine fever virus protein p54 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 115-122.

非洲猪瘟病毒 p54 蛋白单抗制备及 B 细胞线性抗原表位鉴定

陈艳¹, 龙云凤², 姜焱², 周斌^{1*}

(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)

摘要: 以原核系统表达的非洲猪瘟病毒 p54 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 3 株能够稳定分泌抗 p54 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为 2A4、5F6 和 RH15。3 株单克隆抗体的重链均属于 IgG1 亚类, 轻链均为 Kappa 型。Western blot 和免疫荧光试验 (IFA) 证明 3 株单克隆抗体具有良好的反应性, 可以用于靶抗原的特异性检测。通过噬菌体展示文库筛选, 确定了单克隆抗体 2A4、5F6 识别的抗原表位为¹⁵⁷NTASQ¹⁶¹, RH15 识别的抗原表位为¹⁷⁰RQRNTYTHKDL¹⁸⁰, 进一步完善了靶抗原的 B 细胞线性抗原表位信息。

关键词: 非洲猪瘟病毒; p54 蛋白; 单克隆抗体; 抗原表位

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)01-0115-08

Development and B cell linear mapping of monoclonal antibodies against African swine fever virus protein p54

CHEN Yan¹, LONG Yunfeng², JIANG Yan², ZHOU Bin^{1*}

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

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

Abstract: In this study, the recombinant p54 protein of African swine fever virus was expressed in a prokaryotic system and was used as an immunogen to vaccinate BALB/c mice. Then, three hybridoma cell lines that could stably secrete mouse anti-p54 monoclonal antibodies (mAbs) were prepared through cell fusion, indirect ELISA screening, and multiple sub-cloning. These cell lines were named 2A4, 5F6, and RH15, respectively. The heavy chains of the three mAbs belonged to the IgG1, and the light chains were all of the Kappa type. Western blot and indirect immunofluorescence assay showed that the three mAbs exhibited good reactivity and were capable of detecting the target antigen specifically. Epitopes were identified by screening of phage-displayed peptide libraries, which showed that anti-p54 mAbs 2A4 and 5F6 recognized the same epitope ¹⁵⁷NTASQ¹⁶¹, and RH15 recognized ¹⁷⁰RQRNTYTHKDL¹⁸⁰, and further improved the B cell linear epitope mapping of the target antigen.

Keywords: African swine fever virus; p54 protein; monoclonal antibody; epitope mapping

非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 能导致家猪和野猪的出血热, 强毒株致死率可达到 100%。该病毒具有相当高的跨境传播能力, 在非洲、欧洲、美洲和亚洲广泛流行。疫情对猪肉产业的影响严重, 导致全球猪肉供需失衡及价格大幅波动, 世界动物卫生组织 (WOAH) 将非洲猪瘟 (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。近期, ASFV 疫苗的研发和临床应用推广取得了一定进展, 但要想彻底控制病毒传播仍需全球合作和共同努力^[1-3]。

ASFV 是一种双链的核质大 DNA 病毒 (nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDV), 基因组长度为 170~190 kb, 编码 68 种结构蛋白和超过 100 种非结构蛋白^[4]。内膜蛋白 p54 与 p30、p72 被证实为最具抗原性和免疫原性的 ASFV 结构蛋白, 能够诱导产生中和抗体^[5]。针对 p54 的抗体最早出现在感染后第 8 天, 并持续存在数周, 因此, p54 及其抗体常被作为血清学诊断靶点, 用于监测动物 ASFV 感染情况和免疫效力评估^[6]。本研究将 ASFV Pig/H LJ/2018 毒株 (GenBank 号: MK333180) E183L (p54) 基因的膜

收稿日期: 2023-04-21; 修回日期: 2023-10-27

基金项目: 江苏省重点研发计划 (现代农业) 项目 (BE2022394)

第一作者: 陈艳, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 周斌, 教授, 研究方向为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。

内区序列插入到 pET-28a (+) 载体, 通过原核表达系统获得 ASFV 重组 p54 蛋白, 借助杂交瘤技术制备出 3 株针对 p54 蛋白的单克隆抗体, 并利用噬菌体展示肽库鉴定了 3 株抗体所识别的抗原表位, 为 ASFV 诊断方法开发和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

携带 ASFV Pig/HLJ/2018 毒株 E183L (p54) 基因的质粒 pGEX-4T-1-p54 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; ASFV 感染的猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 爬片和 SDS-PAGE 样品由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠; ASFV 阳性血清标准品购自中国兽医微生物菌种保藏中心; 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟病毒 (CSFV)、日本脑炎病毒 (JEV)、抗 p30 蛋白单克隆抗体、小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 由本实验室保存; 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; pET-28a (+) 载体由本实验室保存; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; 感受态细胞 DH5 α 和 BL21 (DE3) 购自北京擎科生物技术有限公司; 6 \times His-tag Ni 亲和层析柱购于 General Electric 公司; 250 kDa 预染蛋白 Marker、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司; 180 kDa 预染蛋白 Marker、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 PALL 公司; HRP 标记兔抗鼠 IgG、FITC 标记羊抗鼠 IgG、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; Ph. D-12 肽库试剂盒、抗 M-13 抗体购自 NEB 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

实验室前期试验表明, 全长的 p54 蛋白难以在原核系统中表达, 因此选择对其进行截短表达。根据 TMHMM-2.0 的蛋白质跨膜区预测结果, 针对 p54 蛋白的膜内区 (157~555 bp, 53~183 aa) 设计常规 PCR 引物, F: 5' - TGACGGATCCATGTCTTCAAG-AAAGAAAAAGC-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点), R: 5' - TGACCTCGAGCAAGGAGTTTTCTAG-GTCT-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点), 扩增产物

长度为 399 bp。以质粒 pGEX-4T-1-p54 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技术有限公司测序。测序正确的重组质粒被命名为 pET-28a-p54 并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 重组 p54 蛋白的原核表达、纯化及反应原性鉴定

将重组质粒 pET-28a-p54 转化到感受态细胞 BL21 (DE3) 中, 得到 p54 重组蛋白原核表达菌株 p54-pET-28a-BL21。将 p54-pET-28a-BL21 的过夜培养物按体积比 1:100 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, 即菌液的 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时, 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, 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。后续试验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 p54 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。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 μ g 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那只, 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, 冻存于液氮中长期保存。

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 p54 稀释到 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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, 最后一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。将阴性对照、阳性对照和样品, 按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。按前述方法洗涤。将 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 单抗以 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 45 min。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 $OD_{450\text{nm}}/\text{阴性样品 } OD_{450\text{nm}}$ (S/N) ≥ 2.1 时判定为阳性。以 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 9 只 12 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 按 3 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, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 p54 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

取感染 ASFV 的 PAM 细胞裂解物, 进行 SDS-PAGE 并转印到 PVDF 膜上, 以杂交瘤细胞上清液作为一抗, 进行 Western blot 反应性鉴定。设立未感染 ASFV 的 PAM 细胞作为阴性对照。

1.5.2 免疫荧光试验 (IFA) 鉴定单克隆抗体的反应性

鉴定抗 p54 单克隆抗体与感染 ASFV 的 PAM 细胞的反应性, 设立未感染 ASFV 的 PAM 细胞作为阴性对照。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、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 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 单克隆抗体的反应特异性鉴定

取 PRRSV、CSFV、JEV 和 ASFV 感染的 PAM 细胞裂解物, 进行 SDS-PAGE 并转印到 PVDF 膜上, 以 3 株杂交瘤细胞上清液混合液作为一抗, 进行 Western blot 反应特异性鉴定。

1.5.4 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。

1.5.5 单克隆抗体的 B 细胞表位鉴定

用 Protein A/G PLUS-Agarose 分别捕获腹水中未纯化的 3 株单克隆抗体, 与 10 μL 噬菌体展示肽原始文库共同孵育, 洗涤 3 次后洗脱下特异性结合的噬菌体, 测定噬菌体滴度, 完成第一次淘选。扩增上一次淘选收集的噬菌体并浓缩至滴度 $\geq 1.5 \times 10^{12}$ pfu/mL, 用于下一次淘选。第 3 次淘选后, 从噬菌斑 < 100 的滴度测定平板上各挑取 30 个单克隆进行间接 ELISA 鉴定。提取阳性噬菌体克隆的基因组, 测序后翻译出展示肽序列, 比对分析得到同一株单克隆抗体结合肽的共有序列, 与 p54 蛋白氨基酸序列进行同源性分析, 确定单克隆抗体识别的抗原表位。详细步骤参考 Ph. D-12 肽库试剂盒说明书。

2 结果

2.1 重组质粒的构建与鉴定

p54 蛋白膜内区基因 (157~555 bp, 53~183 aa) 的 PCR 扩增产物长度与预期的 399 bp 相符 (图 1A)。p54-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-p54 经过双酶切鉴定后获得的片段与目的基因大小一致 (图

1C)。基因测序结果显示，重组质粒的插入序列与目的基因完全一致。

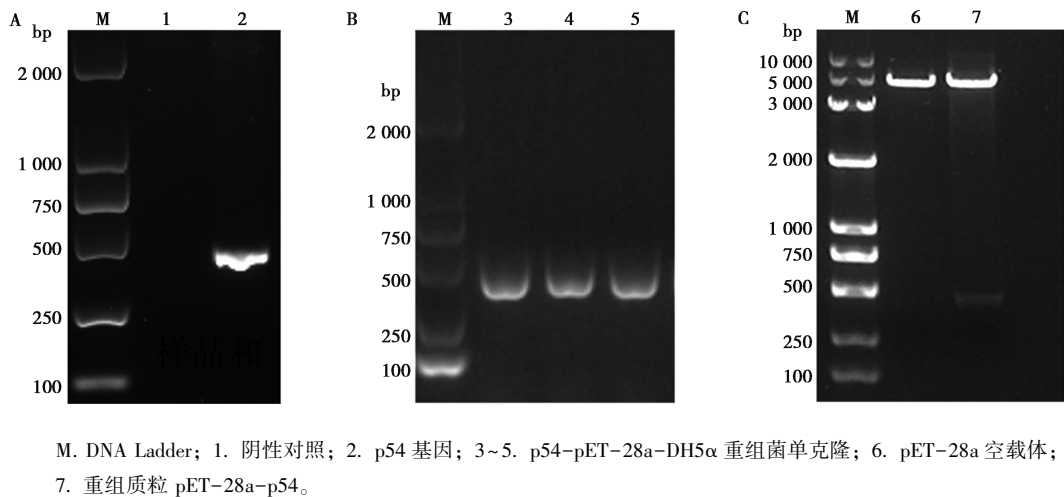


图 1 p54 基因 PCR 扩增 (A)、重组菌菌液 PCR 鉴定 (B) 和重组质粒酶切鉴定 (C)

2.2 重组 p54 蛋白表达、纯化及鉴定

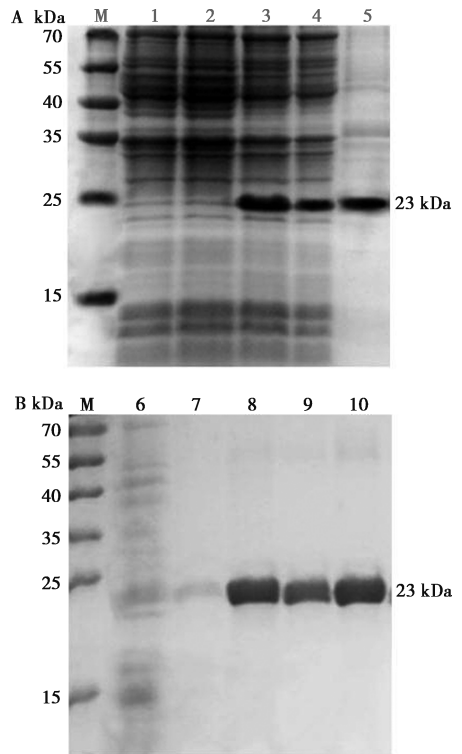
SDS-PAGE 结果显示，重组菌株 p54-pET-28a-BL21 经 IPTG 诱导后大量表达分子量约为 23 kDa 的融合蛋白，与预期大小相符，重组蛋白部分为可溶性表达，部分为包涵体形式 (图 2A)。通过 His-tag 镍离子亲和层析法纯化的可溶性 p54 重组蛋白在电泳后染色呈单一条带，纯化效果良好 (图 2B)。Western blot 显示 His 单克隆抗体和 ASFV 阳性血清标准品均能特异性识别 p54 重组蛋白，表明 p54 重组蛋白成功表达且具有良好的反应原性 (图 3)。

2.3 单克隆抗体的制备

在小鼠第 2 次和第 3 次免疫后分别采集眼眶血，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 p54 蛋白抗体效价均达到 1 : 51 200，可用于细胞融合。

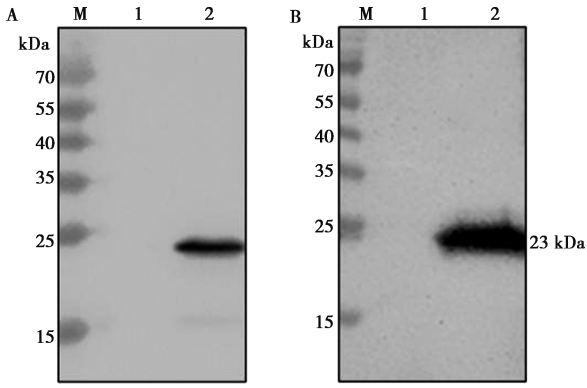
按本研究建立的 ELISA 方法对成功融合的杂交瘤细胞进行筛选和亚克隆，最终获得 3 株能稳定分泌抗 p54 蛋白单克隆抗体的细胞，分别命名为 2A4、5F6 和 RH15。3 株阳性杂交瘤细胞经过连续传代培养 20 代次以上，培养基上清液中抗体效价仍维持在 1 : 12 800 的较高水平，表明其分泌抗体能力稳定。

每株抗 p54 蛋白单克隆抗体的细胞约收集到 10 mL 腹水，按照本研究建立的 ELISA 方法测定腹水体水平，效价均达到 1 : 5 120 000。



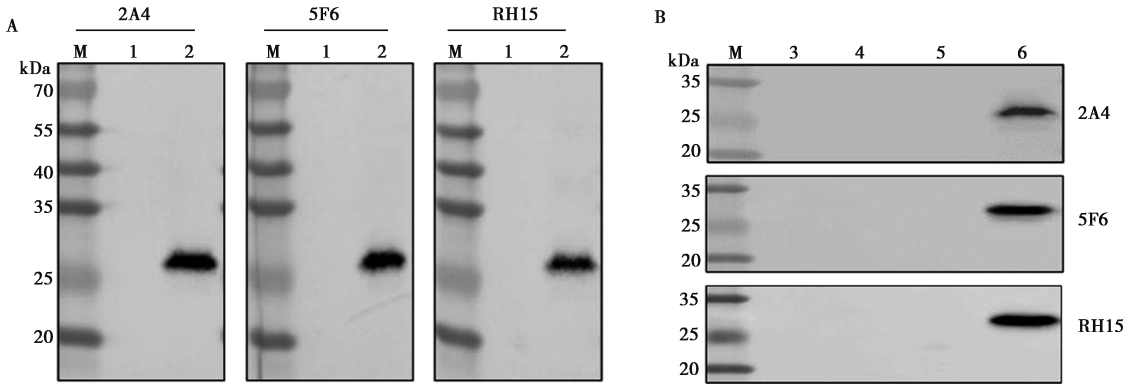
M. 蛋白 Marker; 1. pET-28a-BL21 全菌; 2. 未诱导 p54-pET-28a-BL21 全菌; 3~5. 经诱导的 p54-pET-28a-BL21 全菌及裂解后的上清液、沉淀; 6. 流穿液; 7~10. 含 50、100、200、300 mmol/L 咪唑的洗脱液。

图 2 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白 p54 的原核表达 (A) 及纯化效果 (B)



M. 蛋白 Marker; 1. pET-28a-BL21; 2. p54-pET-28a-BL21。

图3 Western blot 鉴定重组蛋白 p54 与 His 单克隆抗体 (A) 及 ASFV 阳性血清 (B) 的反应性



M. 蛋白 Marker; 1. 未感染的 PAM 细胞; 2. ASFV 感染的 PAM 细胞; 3~6. 依次为 PRRSV、CSFV、JEV 和 ASFV 感染细胞裂解物。

图4 Western blot 鉴定 p54 蛋白单克隆抗体与 ASFV 的反应性 (A) 及反应特异性 (B)

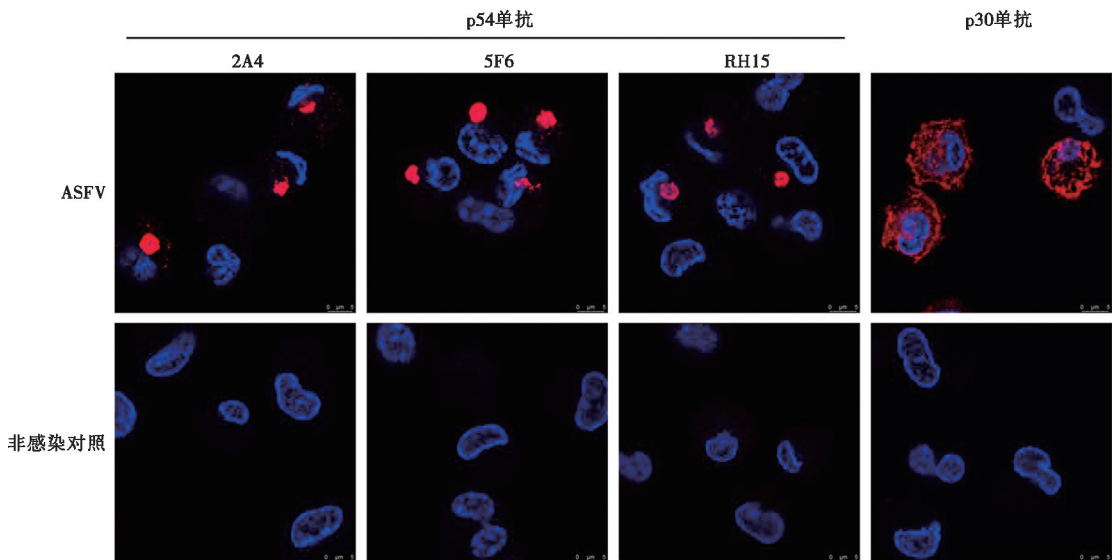


图5 IFA 鉴定 p54 蛋白单克隆抗体与 ASFV 的反应性

2.4 单克隆抗体的反应性鉴定

Western blot 结果表明, 3 株单克隆抗体能够特异性地识别感染 ASFV 的 PAM 细胞 (图 4A), 而不与 PRRSV、CSFV、JEV 感染细胞裂解物发生反应 (图 4B)。

IFA 表明, 3 株单克隆抗体能够识别感染 ASFV 的 PAM 细胞, 产生特异性的红色荧光, 荧光集中于 ASFV 感染细胞的病毒工厂区域。单克隆抗体不与阴性对照细胞发生反应 (图 5)。

2.5 单克隆抗体的亚型鉴定

结果见表 1, 3 株单克隆抗体的重链均属于 IgG1 亚类, 轻链均为 Kappa 型。

表 1 p54 蛋白单克隆抗体亚型鉴定

p54 蛋白单克隆抗体	重链亚类						轻链类型	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
2A4	1.41	0.114	0.111	0.092	0.106	0.104	0.741	0.086
5F6	1.516	0.138	0.154	0.12	0.159	0.13	0.774	0.105
RH15	1.61	0.145	0.137	0.114	0.139	0.121	0.901	0.09

2.6 p54 蛋白的抗原表位鉴定

2.6.1 液相淘洗的富集效果

经过 4 次淘洗，扩增后与扩增前的噬菌体滴度比

值逐渐升高，回收率逐渐增大（表 2），说明与单克隆抗体特异性结合的噬菌体得到了选择性富集。

表 2 4 轮筛选的噬菌体滴度和回收率

p54 蛋白单克隆抗体	淘洗轮次	筛选前/ (pfu · mL ⁻¹)	筛选后/ (pfu · mL ⁻¹)	回收率
2A4	1	1×10 ¹¹	1.6×10 ⁵	1.6×10 ⁻⁶
	2	1×10 ¹¹	2.4×10 ⁶	2.4×10 ⁻⁵
	3	1×10 ¹¹	5.4×10 ⁷	5.4×10 ⁻⁴
	4	1×10 ¹¹	1.1×10 ⁹	1.1×10 ⁻²
5F6	1	1×10 ¹¹	3.8×10 ⁴	3.8×10 ⁻⁷
	2	1×10 ¹¹	3.3×10 ⁵	3.3×10 ⁻⁶
	3	1×10 ¹¹	1.6×10 ⁵	1.6×10 ⁻⁶
	4	1×10 ¹¹	1.5×10 ⁸	1.5×10 ⁻³
RH15	1	1×10 ¹¹	5.6×10 ⁴	5.6×10 ⁻⁷
	2	1×10 ¹¹	2.4×10 ⁵	2.4×10 ⁻⁶
	3	1×10 ¹¹	5.5×10 ⁶	5.5×10 ⁻⁵
	4	1×10 ¹¹	9.3×10 ⁸	9.3×10 ⁻³

2.6.2 间接 ELISA 鉴定淘选

用间接 ELISA 鉴定第 4 次淘选得到的噬菌体。从第 4 次淘选产物滴度测定的 LB/IPTG/X-gal 平板中选择噬菌斑 < 100 个的平板，每种单克隆抗体随机挑取出 30 个蓝色噬菌斑进行扩增，用于间接 ELISA

鉴定。结果显示，单克隆抗体 2A4、5F6、RH15 各有 25、20、28 个阳性噬菌体克隆 (S/N ≥ 2.1)，这表明，经过 4 次淘选，能与 3 株单克隆抗体特异性结合的噬菌体得到有效富集。

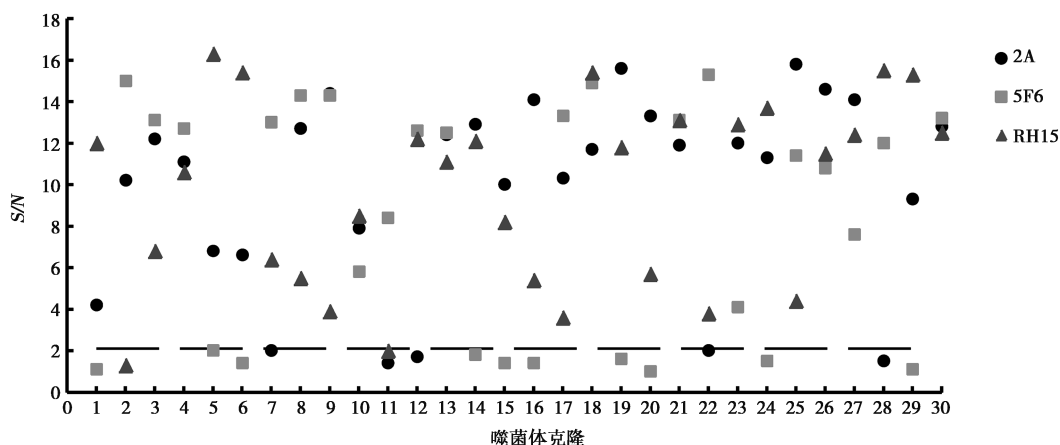


图 6 间接 ELISA 鉴定抗 p54 蛋白单克隆抗体与噬菌体克隆的结合

2.6.3 氨基酸多序列比对分析

提取间接 ELISA 为阳性的噬菌体核酸进行测序, 使用 ExPasy-Translate 在线工具分析得到噬菌体展示的 12 肽序列, 之后用 NCBI Protein BLAST 工具进行同源性分析, 发现单克隆抗体 2A4、5F6 的噬菌体 12 肽共有序列为 NTASQ, 单抗 RH15 的噬菌体 12 肽共有序列为 RQRNTYTHKDL。将这 2 段多肽序列与 ASFV 内膜蛋白 p54 蛋白的氨基酸序列作进一步比对, 结果显示, 单克隆抗体 2A4、5F6 筛选出的共有序列 NTASQ 与 p54 蛋白的 157~161 位氨基酸一致, 单抗 RH15 筛选出的共有序列 RQRNTYTHKDL 则与 p54 蛋白的 170~180 位氨基酸一致, 2 段多肽序列与 p54 蛋白的一级结构有 3 个以上的连续氨基酸残基重合, 说明 3 株单抗识别的抗原表位均为线性表位。

3 讨论

自 2018 年 8 月 ASF 在中国首次被报道以来, 疫情迅速蔓延至全国, 仅 4 个月已有 21 个省份受到波及, 63.1 万头生猪被扑杀。同时期, ASF 在全球的流行也很活跃, 包括俄罗斯、罗马尼亚、波兰在内的 22 个国家累计报告发生疫情 5 800 余起^[7-8]。急性型 ASF 不仅致死率可高达 100%, 还具有极强的传播能力, 严重打击了全球养猪业, 引起猪肉市场价格的大幅波动。ASFV 疫苗研制始于 1960 年, 由于病毒具有遗传多变性、结构复杂等特点, 对单核-巨噬细胞之外的非靶细胞适应性差, 易发生生物学特性的改变, 另外宿主免疫保护和病毒免疫逃避机制也尚不明晰, 因此疫苗的研发进程较为缓慢^[9-11]。2022 年 6 月, 首个商品化 ASFV 疫苗 NAVET-ASFVAC 在越南上市, 该疫苗是由高毒力的 ASFV Georgia 2007/1 株缺失 I177L 基因后制备的减毒活疫苗, 经评估能在强毒株感染后给生长育肥猪提供有效的免疫保护, 阻断动物死亡并阻止经济损失^[12]。不过, 接种 NAVET-ASFVAC 的猪群存在严重的排毒现象, 不能排除毒力返强、变异和基因整合等风险, 疫苗对母猪群的安全性评价并不明确, 现今该疫苗的应用范围仅局限于越南国内^[12-13]。综上, 由于缺乏有效的治疗药物和安全的且能够阻断病毒感染的疫苗, 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^[14-15]。

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, 被广泛地应用于生物学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]。抗 ASFV 单克隆抗体的研制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, 有针对性地开发疫苗, 同时为建立高特异、高灵敏性的血清学诊断方法提供材料^[17]。在以往研究中, 结构蛋白 p30、p54、p72 被证明在 ASFV 感染过程中表现出强抗原性, 且针对这 3 种蛋白的抗体具有一定的中和活性, 能够抑制病毒的黏附和内化^[5]。遗憾的是, 这 3 种蛋白并不足以引起完全的由抗体介导的体内中和作用, 无法对不同毒株的感染产生有效的免疫保护, 因此候选 ASFV 亚单位疫苗的应用局限性较大, 仅仅能够延缓临床症状的出现时间和降低病毒血症水平^[18]。不过在 ASFV 血清学诊断方面, 这些蛋白仍然是相当重要的靶标^[19-20]。

本研究通过原核表达系统成功表达了 ASFV p54 重组蛋白, 免疫小鼠后使用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 经过间接 ELISA 筛选和多次亚克隆获得了 3 株能够稳定分泌抗 p54 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系。Western blot 试验显示, 3 株单克隆抗体均能与 ASFV 感染的猪肺泡巨噬细胞发生特异性反应; IFA 试验也显示, 3 株单克隆抗体能够识别 ASFV 感染的猪肺泡巨噬细胞, 证明这 3 株单抗具有良好的反应性, 可用于靶抗原的特异性检测。在 IFA 试验中可以看到, 与作为阳性对照的抗 p30 蛋白单克隆抗体分布在胞浆中的弥散性点状荧光不同, 本研究制备的 3 株单克隆抗体所识别的靶蛋白 p54 集中定位于靠近细胞核的病毒工厂中, 呈致密的斑点状荧光, 这一表现与以往关于 ASFV 结构蛋白定位的研究相符^[21-23]。亚型鉴定试验显示, 3 株单克隆抗体的重链均属于 IgG1 亚类, 轻链均为 Kappa 型, 提示后续抗体纯化如以腹水为来源材料时可能去除其中的自身免疫球蛋白 (一般为 IgG1 和 IgM)。通过噬菌体展示肽库筛选, 确定了抗 p54 蛋白单克隆抗体 2A4、5F6 识别的抗原表位为¹⁵⁷NTASQ¹⁶¹, 该表位与 p54 蛋白的动力蛋白轻链 (DYNLL1/DLC8) 结合域¹⁵¹TTVTTQNTASQT¹⁶²存在部分重合^[24-25], 后续将探究这 2 株单克隆抗体阻断此结合位点的潜力, 以期与研究 ASFV 与宿主蛋白的相互作用提供精准的生物学工具。单克隆抗体 RH15 识别的抗原表位经鉴定为¹⁷⁰RQRNTYTHKDL¹⁸⁰, 该表位目前未被免疫表位数据库 (IEDB) 收录, 也未见有相关文章报道, 这一结果丰富了 p54 蛋白的 B 细胞线性抗原表位信息, 可为进一步解析 ASFV 结构蛋白的功能结构域和更有针对性地设计亚单位疫苗提供参考。

参考文献:

[1] BORCA M V, RAI A, RAMIREZ - MEDINA E, et al. A Cell

- culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain [J]. *J Virol*, 2021, 95 (14): e0012321.
- [2] BORCA M V, RAMIREZ-MEDINA E, SILVA E, et al. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain [J]. *J Virol*, 2020, 94 (7).
- [3] BRAKE D A. African swine fever modified live vaccine candidates: transitioning from discovery to product development through harmonized standards and guidelines [J]. *Viruses*, 2022, 14 (12): 2619.
- [4] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle [J]. *J Virol*, 2018, 92 (23).
- [5] GÓMEZ-PUERTAS P, RODRÍGUEZ F, OVIEDO J M, et al. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization [J]. *J Virol*, 1996, 70 (8): 5689-5694.
- [6] RODRIGUEZ F, ALCARAZ C, EIRAS A, et al. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54 [J]. *J Virol*, 1994, 68 (11): 7244-7252.
- [7] DIXON L K, SUN H, ROBERTS H. African swine fever [J]. *Antiviral Res*, 2019, 165: 34-41.
- [8] SÁNCHEZ-CORDÓN P J, MONTOYA M, REIS A L, et al. African swine fever: a re-emerging viral disease threatening the global pig industry [J]. *Vet J*, 2018, 233: 41-48.
- [9] ROCK D L. Challenges for African swine fever vaccine development—“... perhaps the end of the beginning.” [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 52-58.
- [10] ROCK D L. Thoughts on African swine fever vaccines [J]. *Viruses*, 2021, 13 (5): 943.
- [11] 雷建林, 曹宏, 杨丽霞, 等. 非洲猪瘟病毒的生物学特性与疫苗研制的难点 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36 (1): 13-24.
- [12] TRAN X H, LE T T P, NGUYEN Q H, et al. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (4): e497-e504.
- [13] TRAN X H, PHUONG L T T, HUY N Q, et al. Evaluation of the safety profile of the ASFV vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L [J]. *Viruses*, 2022, 14 (5).
- [14] 张涛, 李红, BLOME S, 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.
- [15] 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.
- [16] HOWARD G C, KASER M R. Making and using antibodies: a practical handbook [M]. Boca Raton: CRC Press, 2013: 395-397.
- [17] PETROVAN V, YUAN F, LI Y, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus [J]. *Virus Res*, 2019, 269: 197632.
- [18] NEILAN J G, ZSAK L, LU Z, et al. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection [J]. *Virology*, 2004, 319 (2): 337-342.
- [19] GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, et al. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16 (7): 1012-1020.
- [20] CUBILLOS C, GÓMEZ-SEBASTIAN S, MORENO N, et al. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples [J]. *Virus Res*, 2013, 173 (1): 159-167.
- [21] HERNÁEZ B, ESCRIBANO J M, ALONSO C. Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera [J]. *Virology*, 2006, 350 (1): 1-14.
- [22] CHEN X, CHEN X, LIANG Y, et al. Interaction network of African swine fever virus structural protein p30 with host proteins [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 971888.
- [23] MOSHE A, GOROVITS R. Virus-induced aggregates in infected cells [J]. *Viruses*, 2012, 4 (10): 2218-2232.
- [24] ALONSO C, MISKIN J, HERNÁEZ B, et al. African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein [J]. *J Virol*, 2001, 75 (20): 9819-9827.
- [25] HERNÁEZ B, TARRACÓ T, GIRALT E, et al. Small peptide inhibitors disrupt a high-affinity interaction between cytoplasmic dynein and a viral cargo protein [J]. *J Virol*, 2010, 84 (20): 10792-10801.