

司安琪, 王淑娟, 张永强, 等. 非洲猪瘟病毒 CP312R 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 101-106.

SI A Q, WANG S J, ZHANG Y Q, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against CP312R protein of African swine fever virus [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 101-106.

非洲猪瘟病毒 CP312R 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

司安琪^{1,2#}, 王淑娟^{2#}, 张永强², 王筱真², 任炜杰², 郑龙三^{1*}, 包静月^{2*}, 王志亮^{2*}

(1. 南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室/农业农村部细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 中国动物卫生与流行病学中心/国家非洲猪瘟参考实验室, 山东 青岛 266032)

摘要: 为了深入研究非洲猪瘟病毒 (ASFV) CP312R 蛋白的生物学特性, 为血清学诊断技术研究和疫苗研发提供材料, 制备了 CP312R 蛋白的单克隆抗体。将原核表达质粒 pGEX-6p-CP312R 转化至大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) 细胞中, 用 IPTG 诱导 CP312R 蛋白表达并纯化, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析鉴定重组蛋白表达产物的抗原性, 用纯化后的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 在进行 4 次免疫后, 取加强免疫后的小鼠脾脏进行细胞融合, 经阳性克隆筛选后, 获得了 2 株能够稳定分泌抗 CP312R 蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞。通过 Western blot 和间接免疫荧光 (IFA) 等试验对所获得的单克隆抗体的特异性进行鉴定, Western blot 结果显示, 制备的 2 株单克隆抗体均能与 CP312R 蛋白发生特异性反应; IFA 结果显示, 2 株单克隆抗体均能与 ASFV 感染的猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 产生特异性绿色荧光。综上, 本研究制备的 2 株单克隆抗体, 为非洲猪瘟血清学诊断及疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 非洲猪瘟病毒; CP312R 蛋白; 单克隆抗体; 原核表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)04-0101-06

Generation and characterization of monoclonal antibodies against CP312R protein of African swine fever virus

SI Anqi^{1,2#}, WANG Shujuan^{2#}, ZHANG Yongqiang², WANG Xiaozhen², REN Weijie²,
JUNG Yongsam^{1*}, BAO Jingyue^{2*}, WANG Zhiliang^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/MOE Joint International Research Laboratory of Animal Health and Food Safety/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center/National African Swine Fever Reference Laboratory, Qingdao 266032, China)

Abstract: To deeply study the biological characteristics of CP312R protein and provide basis for serological diagnostic technology research and vaccine development, monoclonal antibodies of African swine fever virus (ASFV) CP312R protein were prepared. The prokaryotic expression plasmid pGEX-6p-CP312R was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells and purified after inducing expression with IPTG. The antigenicity of the recombinant protein was determined by SDS-PAGE and Western blot analysis. Then, BALB/c mice were immunized with the purified protein. After cell fusion and positive clone screening, two positive hybridoma cells that could stably secrete CP312R monoclonal antibodies were obtained. The Western blot results showed that two monoclonal antibodies were able to react specifically with the CP312R protein. The IFA results showed that both monoclonal antibodies produced specific green fluorescence. The two monoclonal antibodies prepared in this study laid the foundation for the study of the serological diagnostic method and vaccine of ASFV.

Keywords: African swine fever virus; CP312R protein; monoclonal antibody; prokaryotic expression

收稿日期: 2024-04-16; 修回日期: 2025-02-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800500)

第一作者: 司安琪, 女, 硕士研究生; 王淑娟, 女, 副研究员。[#]共同第一作者

* 通信作者: 郑龙三, 韩国, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物传染病防控, E-mail: ysjung@njau.edu.cn; 包静月, 博士, 研究员, 研究方向为重大外来动物疫病防控技术, E-mail: baojingyue88@163.com; 王志亮, 博士, 研究员, 研究方向为重大外来动物疫病防控技术, E-mail: wangzhiliang@cahec.cn。

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是猪的一种病毒性的烈性传染病, 可感染家猪和野猪, 家猪感染通常会引发出血热, 发病率和病死率高达 100%, 野猪等自然宿主感染通常不表现明显的临床症状。ASF 主要通过直接接触或软蜱等吸血昆虫进行传播, 也可通过空气等途径传播^[1-2]。ASF 是我国重点防范的一类动物疫病^[3]。

非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 是一种大型的包膜病毒, 根据其主要衣壳蛋白 p72 基因 C 端可变区的序列差异, 可将病毒分为 24 个基因型^[4]。1909 年, ASF 在非洲出现, 1921 年, 肯尼亚首次报道^[5], 随后一直在撒哈拉以南非洲扩散传播。1957 年, ASF 首次传入葡萄牙^[6], 之后传入西欧国家。到 20 世纪 90 年代中期, 除了撒丁岛仍有流行外, ASF 在美洲和欧洲被成功根除^[7]。2007 年, ASF 传入格鲁吉亚, 随后传至欧洲、亚洲、加勒比海地区和大洋洲, 对全球养猪业造成严重危害^[8]。2018 年 8 月 ASF 在我国发生以来, 迅速传播至全国各地, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失。

ASFV 的病毒粒子呈二十面体, 直径 200 ~ 250 nm, 具有多层结构^[9], 基因组是一条双链 DNA, 碱基数多达 17 万 ~ 19 万个, 编码 150 ~ 200 种蛋白质^[10]。这些蛋白参与组成病毒结构、病毒的免疫逃逸和 DNA 复制, 我国目前尚无安全有效的商品化疫苗用于防控。因此, 筛选 ASFV 免疫原性好的蛋白, 鉴定免疫相关基因, 将有助于 ASFV 诊断试剂和疫苗的研发。CP312R 是一种多阶段表达的蛋白, 具有较好的免疫原性和单链 DNA (ssDNA) 结合活性^[11]。Pérez-Núñez 等^[12]使用改良的 prime-boost 方法对选定的病毒 DNA 和重组蛋白的组合对猪进行免疫, 发现 CP312R 可增强针对 p54 和 CD_{2v}-E 产生的抗体反应。周晓丽等^[13]利用免疫表位数据库预测和筛选了 ASFV CP312R 蛋白的 T 细胞表位, 最后筛选出 2 条表位肽 PP8 和 PP9, 均可促进抗原特异性脾淋巴细胞增殖, 促进 CD8⁺T 细胞分泌 γ 干扰素 (IFN- γ), 显著抑制 ASFV 的复制。这些研究都表明, CP312R 是一个具有较好免疫原性和诊断潜力的蛋白。

本研究通过大肠杆菌表达系统成功表达 CP312R 重组蛋白, 并通过 GST 标签蛋白纯化试剂盒纯化, 将纯化后的重组蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠后制备单克隆抗体, 经筛选和鉴定, 最终获得了 2 株特异性较强的单克隆抗体, 为 ASF 血清学诊断试剂的研发及疫苗研究提供了重要材料。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和实验动物

大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) 细胞购自大连宝生物有限公司; 原核表达质粒 pGEX-6p-CP312R 由中国动物卫生与流行病学中心构建并保存; 4~6 周龄的无特定病原体级别的 BALB/c 雌性小鼠购于山东省实验动物中心。

1.2 病毒、细胞和主要试剂

ASFV China/CN/2018/1 毒株和小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由中国动物卫生与流行病学中心制备并保存; 原代猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 取自 ASF 阴性的正常仔猪, 由中国动物卫生与流行病学中心保存; GST 标签蛋白纯化试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; IPTG、HRP 标记的山羊抗猪 IgG 二抗购自 Sigma 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Abcam 公司; 0.45 mm PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 96 孔酶标板购自 Thermo Fisher Scientific 公司; TMB 底物显色液购自南京建成生物工程研究所。

1.3 重组 CP312R 蛋白的原核表达与纯化

将阳性重组表达质粒 pGEX-6p-CP312R 转化至大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) 中, 涂板后在恒温培养箱中 37 °C 过夜。单菌落长出后, 用接种环挑取单个菌落加入到 5 mL 含有氨苄西林 (Amp, 浓度为 50 μ g/mL) 的液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。按照 1 : 100 的比例, 各取 50 μ L 的菌液转接到两管 5 mL 含有 50 μ g/mL Amp+ 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养直至 $OD_{600\text{nm}}$ 值至 0.6~0.8, 以 1 : 1 000 的比例加入 IPTG, 使其终浓度为 1 mmol/L, 另一管不加诱导剂作为对照, 放入摇床, 37 °C、220 r/min 振荡培养 4 h。取 IPTG 诱导表达后的菌液和对照组菌液各 1 mL 于 12 000 r/min 离心 1 min, 离心后弃上清液, 沉淀用 50 μ L PBS 重悬后, 再加入蛋白上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后进行 SDS-PAGE 鉴定表达情况, 将表达条带大小正确的对照未诱导的菌液 1 : 1 加入 30% 甘油, 于 -20 °C 保存备用。

取 10 μ L 保存的菌液加入到 10 mL 含有 Amp+ (浓度为 50 μ g/mL) 的液体 LB 培养基中, 在 37 °C (220 r/min) 条件下振荡培养过夜, 使其活化。取 5 mL 活化的重组菌液加入到 500 mL 含有 50 μ g/mL Amp+ 的液体 LB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 振荡培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 值到 0.6~0.8 时, 向管中加入 IPTG, 使其终浓度为 1 mmol/L, 于 16 °C 低温诱导 16 h。将诱导的菌液离心, 每克诱导表达的菌体中加入 4 mL 细菌裂解液和 40 μ L 溶菌酶, 冰浴中进行超声以裂解菌体, 使用 GST 标签蛋白纯化试剂盒对蛋白进行

纯化。

1.4 重组 CP312R 蛋白的免疫学活性鉴定

取适量纯化后的重组蛋白，加入等体积的 $2\times$ SDS，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后，转印至 PVDF 膜，用含 0.5 mL/L 吐温 20 的 PBST 配制 5% BSA 溶液，室温摇床封闭 2 h。PBST 洗 5 次（5 min/次），取 100 μ L 的 ASFV 阳性血清按 1 : 50 的比例加入 5% BSA 溶液作为一抗，4 $^{\circ}$ C 过夜孵育；PBST 洗 5 次（5 min/次），HRP 标记的山羊抗猪 IgG 1 : 5 000 稀释作为二抗，室温孵育 1 h，PBST 洗 5 次（5 min/次）。将 HRP 化学发光底物 A 液与 B 液 1 : 1 混合，加在 PVDF 膜上，利用 ECL 发光成像系统显色。

1.5 ASFV CP312R 单克隆抗体的制备

1.5.1 动物免疫及血清效价的测定

选取 4 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠，以纯化后的重组 CP312R 蛋白作为抗原，以 60 μ g/只的剂量与等体积的弗氏完全佐剂混匀并充分乳化后，对其多点皮下注射作为一免，14 d 后，以 30 μ g/只的剂量与等体积的弗氏不完全佐剂混合并乳化，以同样的操作进行二免，共免疫 3 次。最后一次免疫 1 周后，对被免疫的 4 只小鼠进行眼眶采血，采用间接 ELISA 方法测定 4 只小鼠血清中抗体的效价。将纯化后的重组 CP312R 蛋白用包被液稀释至 2 μ g/mL，每孔 100 μ L 包被到酶标板中，4 $^{\circ}$ C 放置过夜；次日，将酶标板用 PBST 洗涤 3 次，每孔加 150 μ L 的封闭液（含 5% BSA 的 PBST）进行封闭，37 $^{\circ}$ C 放置 2 h；用含 1% BSA 的 PBS 将小鼠血清按 1 : 200~1 : 102 400 进行二倍比稀释，用 PBST 洗涤酶标板 3 次后，每孔加入 50 μ L 稀释好的血清，并设置阴性对照（阴性血清 1 : 100 稀释），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h；用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 50 μ L 的 HRP 标记的山羊抗鼠二抗（1 : 5 000），于 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h；用 PBST 洗板 3 次后，在吸水纸上将液体拍干，每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液，室温避光显色；15 min 后向孔中加入 50 μ L 终止液，然后用酶标仪读取各孔的 $OD_{450\text{nm}}$ 值。选择血清效价最高的小鼠，直接腹腔注射 50 μ g 纯化后的重组 CP312R 蛋白，进行加强免疫。

1.5.2 细胞融合和亚克隆筛选

加强免疫 1 周后，脱颈处死小鼠，将分离的脾细胞与准备好的 SP2/0 细胞以 5 : 1 的比例混合，在 37 $^{\circ}$ C 水浴条件下向其中缓慢加入 PEG，进行细胞融合。融合结束后，将细胞悬液离心弃上清液，加入 HAT 培养基吹打混合均匀，加入到前一天准备好的铺有饲养细胞的 96 孔细胞板中，100 μ L/孔，培养 5~7 d 时进行半换液，再培养 2~3 d 后吸弃 96 孔板中的上清液，全换液成 HT 培养基。然后以原核表达

的 CP312R 重组蛋白为包被抗原包被酶标板，利用间接 ELISA 方法对阳性杂交瘤细胞进行筛选。筛选出阳性克隆孔后，通过有限稀释法对其中的细胞进行亚克隆。经过 3 次亚克隆后，对筛选出来的稳定表达 CP312R 的孔进行扩大培养。

1.5.3 腹水制备

取 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠，将 500 μ L 高压灭菌后的液体石蜡通过腹腔注射到每只小鼠体内，1 周后，向小鼠体内腹腔注射阳性单克隆杂交瘤细胞，观察小鼠的状态以及腹部隆起状况，7~10 d 后采集腹水，于 3 000 r/min 离心 5 min 后进行分装，置于 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.6 ASFV CP312R 单克隆抗体的鉴定

1.6.1 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

取适量纯化的重组 CP312R 蛋白，加入等体积的 $2\times$ SDS 并于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min，进行 SDS-PAGE 分析，转印至 PVDF 膜上，使用封闭液（含 5% BSA 的 PBST）于室温封闭 2 h；用 PBST 洗膜 5 次后，以 1 : 2 000 稀释的单克隆抗体为一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；用 PBST 洗膜 5 次后，以 1 : 5 000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗，于室温孵育 1 h；充分清洗后，将 HRP 化学发光底物 A 液与 B 液 1 : 1 混合，滴加在 PVDF 膜上，在 ECL 发光成像系统观察。

1.6.2 间接免疫荧光试验 (IFA)

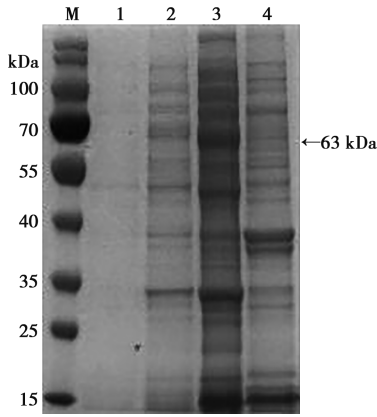
利用感染复数 (MOI) 为 1 的 ASFV 感染 PAM 细胞，并设置正常细胞为阴性对照，培养 48 h 后处理样品。首先弃去孔中上清液，用 PBS 轻柔清洗细胞；然后用甲醛室温固定 10 min，再用 PBS 清洗细胞 3 次；用 BSA 封闭后，加入 1 : 200 稀释的单克隆抗体作为一抗，每孔加入 300 μ L 用 PBS 稀释 500 倍的山羊抗鼠 IgG 作为二抗，洗涤封片后在共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 重组 CP312R 蛋白的表达与纯化

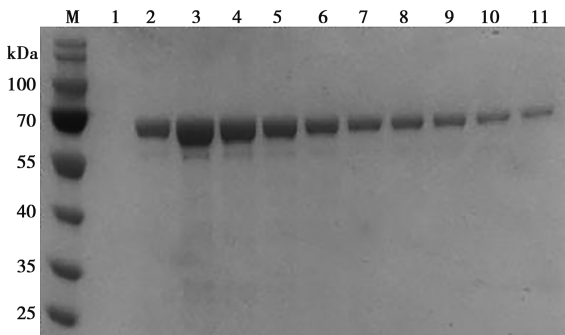
将原核表达质粒 pGEX-6p-CP312R 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中并加入 IPTG 进行诱导表达，超声破碎后分离上清液和沉淀，SDS-PAGE 可见 60 kDa 的融合蛋白，与预期相符，且主要以可溶性的形式表达（图 1）。

使用 GST 标签蛋白纯化试剂盒对经 IPTG 大量诱导表达的 CP312R 重组蛋白进行纯化，取适量纯化后的蛋白，加入等体积的 $2\times$ SDS 混合均匀并于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后，进行 SDS-PAGE，结果显示，在 60 kDa 处出现单一条带（图 2），且没有杂带，表明纯化后的 CP312R 蛋白纯度较高。



M. 蛋白质分子质量标准；1. 未诱导的 pGEX-6p-CP312R；2. 诱导的 pGEX-6p-CP312R 全菌体；3. 诱导的 pGEX-6p-CP312R 上清液；4. 诱导的 pGEX-6p-CP312R 沉淀。

图 1 重组 CP312R 蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定

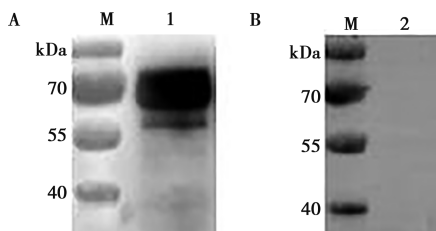


M. 蛋白质分子质量标准；1~11. 纯化的重组 CP312R 蛋白。

图 2 重组 CP312R 蛋白纯化的 SDS-PAGE 鉴定

2.2 重组 CP312R 蛋白的免疫学活性鉴定

利用 Western blot 对重组 CP312R 蛋白的免疫学活性进行鉴定，使用 50 倍稀释的 ASFV 阳性血清作为一抗对 PVDF 膜进行孵育后，发现原核表达的重组 CP312R 蛋白能够与 ASFV 阳性血清发生强烈的特异性结合（图 3），说明其反应原性良好。



M. 蛋白质分子质量标准；1. 重组 CP312R 蛋白与 ASFV 阳性血清的免疫学活性；2. 重组 CP312R 蛋白与阴性血清的免疫学活性。

图 3 重组 CP312R 蛋白的免疫学活性鉴定

2.3 血清效价的测定

三免 7 d 后，采用间接 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中抗体的效价（图 4），结果显示 2 号小鼠血清效价最高，选取 2 号小鼠进行加强免疫。

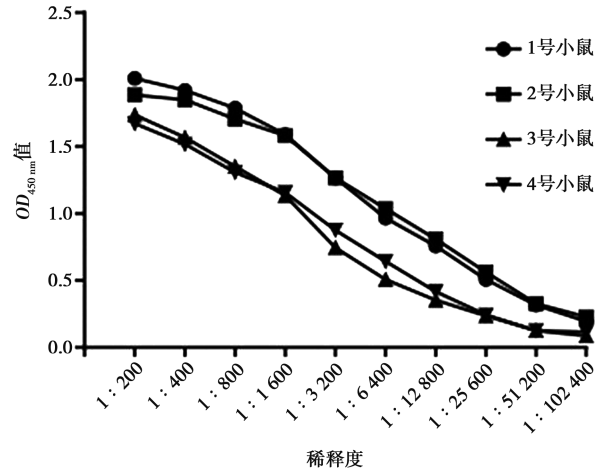
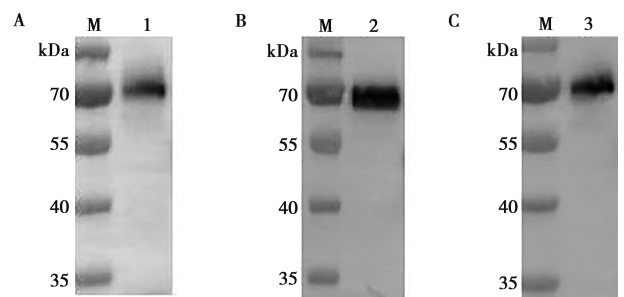


图 4 血清效价的测定

2.4 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

通过有限稀释法对阳性孔中的杂交瘤细胞进行亚克隆，经过 3 次亚克隆后，获得 2 株能够稳定分泌的细胞株，通过腹腔注射到小鼠体内获得单克隆抗体，将其分别命名为 6C4 和 7E8。

取适量原核表达的 CP312R 重组蛋白，加入等体积的 2×SDS 混合均匀并煮沸 10 min 后，进行 SDS-PAGE，转印至 PVDF 膜，用获得的 2 株单克隆抗体为一抗对其进行孵育，进行 Western blot 验证，结果显示，2 株单克隆抗体均能够很好地识别原核表达的 CP312R 蛋白（图 5）。



M. 蛋白质分子质量标准；1. GST；2. 6C4；3. 7E8。

图 5 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

2.5 单克隆抗体的 IFA 鉴定

利用 200 倍稀释的单克隆抗体（6C4、7E8）作为一抗进行 IFA 检测。结果如图 6 和 7 所示，感染了 ASFV 的 PAM 细胞在与单克隆抗体孵育后，产生了特异性绿色荧光，而对照组没有出现荧光。

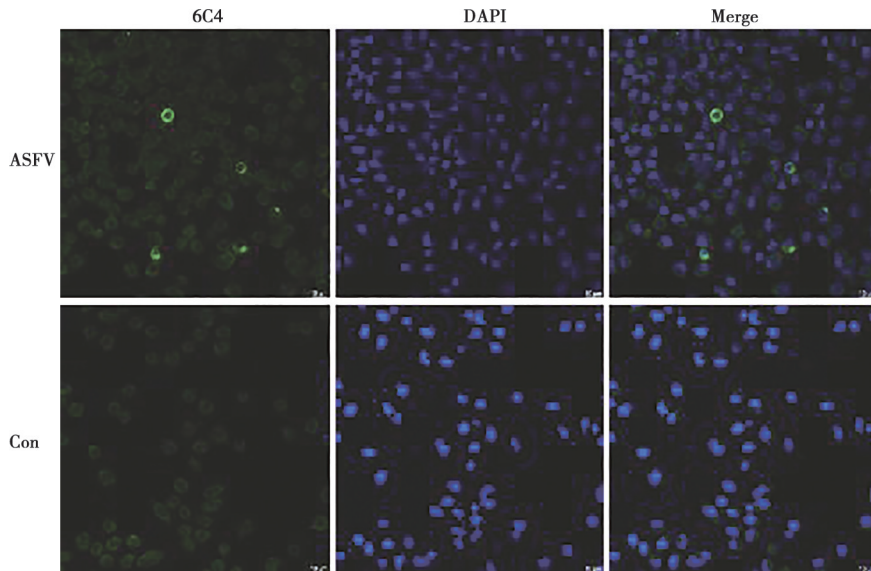


图 6 CP312R 单克隆抗体 6C4 的 IFA 鉴定 (200×)

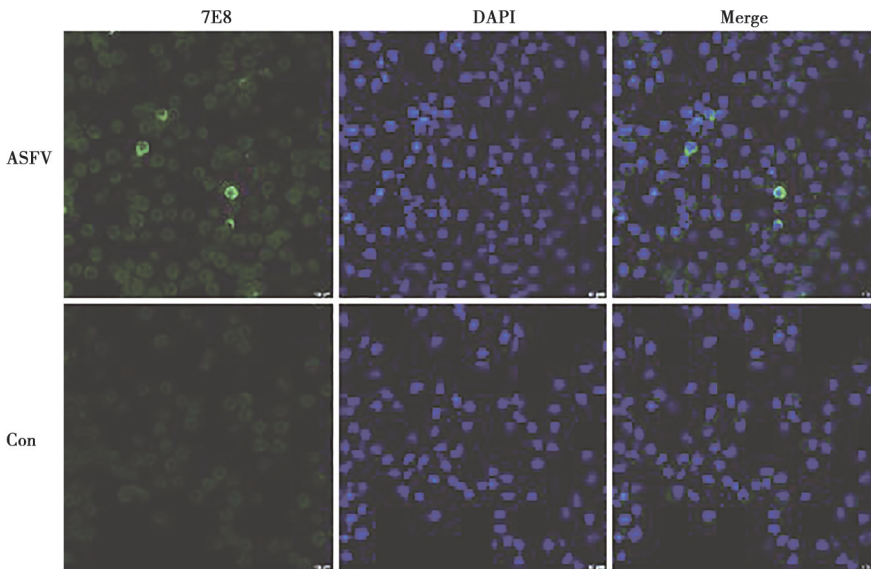


图 7 CP312R 单克隆抗体 7E8 的 IFA 鉴定 (200×)

3 讨论

ASF 作为高致死性传染病在全球蔓延。目前,在我国传播的 ASFV 主要为基因 II 型毒株^[14],基因 I 型毒株也有报道^[15],2021—2022 年间还出现了重组毒株^[16]。ASFV 的遗传复杂性高、发病机制信息不足、许多基因未得到充分研究,流行毒株呈现多样性,目前我国尚未有通过审批的有效的 ASFV 疫苗。筛选免疫原性良好的蛋白对血清学诊断方法的建立以及疫苗的研发至关重要。有研究发现,CP312R 蛋白在被感染的 HEK 293 细胞和 Vero 细胞中高水平表达^[17],这表明 CP312R 蛋白可能在感染的早期阶段发挥作用。2002 年, Kollnberger 等^[18]通过马耳他

(Malta) 分离株的抗血清对 Ba71V 株感染 Vero 细胞构建的文库进行筛选,最终鉴定出 14 个能刺激抗体反应的 ASFV 病毒蛋白 (pB602L、pC44L、pCP312R、pE184L、pK145R、pK205R、pA104R、p10、p32、p54、p72、pF334L、pNP419L 和 pK196R),其中在有临床症状的猪体内, NP419L、CP312R、B646L、K196R 和 K205R 的抗体滴度更高^[19-20]。2023 年, Xu 等^[21]对 35 个 ASFV 结构蛋白/高表达量蛋白进行了抗原性筛选,结果表明 CP312R 等 12 个融合蛋白均能与 5 份临床阳性血清和部分实验猪血清产生反应。上述研究表明, CP312R 蛋白的抗原性较好,也可作为诊断抗原用于血清学诊断和疫苗研发的靶点。

本研究通过原核系统表达并纯化了 CP312R 重组蛋白, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对所获得的重组蛋白进行分析, 该蛋白具有很高的纯度, 反应原性良好。随后以纯化后的 CP312R 重组蛋白作为免疫原对小鼠进行免疫, 制备出 2 株针对该蛋白的单克隆抗体, Western blot 结果表明, 2 株单克隆抗体均可特异性识别 CP312R 蛋白; IFA 鉴定结果表明, 在与单克隆抗体孵育过后, ASFV 感染的 PAM 细胞产生了特异性绿色荧光。本研究成功制备的单克隆抗体为 ASF 血清学诊断及疫苗研究奠定了基础, 为进一步研究 ASFV CP312R 蛋白生物学特性提供了材料。

参考文献:

- [1] TULMAN E R, DELHON G A, KU B K, et al. African swine fever virus [M] //VANETTEN J L. Lesser known large dsdna viruses. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 43-87.
- [2] 王清华, 任炜杰, 包静月, 等. 我国首例非洲猪瘟的确诊 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35 (9): 1-4.
- [3] WU K K, LIU J M, WANG L X, et al. Current state of global African swine fever vaccine development under the prevalence and transmission of ASF in China [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8 (3): 531.
- [4] QUEMBO C J, JORI F, VOSLOO W, et al. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65 (2): 420-431.
- [5] PENRITH M L, VOSLOO W, JORI F, et al. African swine fever virus eradication in Africa [J]. Virus Research, 2013, 173 (1): 228-246.
- [6] PENRITH M L, BASTOS A D, ETTER E M C, et al. Epidemiology of African swine fever in Africa today: sylvatic cycle versus socio-economic imperatives [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66 (2): 672-686.
- [7] MOURA J A, MCMANUS C M, BERNAL F E M, et al. An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication [J]. Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties, 2010, 29 (3): 549-563.
- [8] DIXON L K, SUN H, ROBERTS H. African swine fever [J]. Antiviral Research, 2019, 165: 34-41.
- [9] GALINDO I, ALONSO C. African swine fever virus: a review [J]. Viruses, 2017, 9 (5): 103.
- [10] DIXON L K, CHAPMAN D A G, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. Virus Research, 2013, 173 (1): 3-14.
- [11] HAGOSS Y T, SHEN D D, ZHANG Z J, et al. Novel epitopes mapping of African swine fever virus CP312R protein using monoclonal antibodies [J]. Viruses, 2023, 15 (2): 557.
- [12] PÉREZ-NUÑEZ D, SUNWOO S Y, SÁNCHEZ E G, et al. Evaluation of a viral DNA-protein immunization strategy against African swine fever in domestic pigs [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2019, 208: 34-43.
- [13] 周晓丽, 毛箬青, 朱紫祥, 等. 非洲猪瘟病毒 CP312R 蛋白 T 细胞表位的筛选及抗原性分析 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52 (4): 410-416
- [14] MONTEAGUDO P L, LACASTA A, LÓPEZ E, et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities [J]. Journal of Virology, 2017, 91 (21): e01058-17.
- [15] SUN E C, HUANG L Y, ZHANG X F, et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection [J]. Emerging Microbes & Infections, 2021, 10 (1): 2183-2193.
- [16] ZHAO D M, SUN E C, HUANG L Y, et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs [J]. Nature Communications, 2023, 14 (1): 3096.
- [17] CACKETT G, MATELSKA D, SYKORA M, et al. The African swine fever virus transcriptome [J]. Journal of Virology, 2020, 94 (9): e00119-20.
- [18] KOLLNBERGER S D, GUTIERREZ-CASTANEDA B, FOSTER-CUEVAS M, et al. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody [J]. J Gen Virol, 2002, 83 (Pt 6): 1331-1342.
- [19] REIS A L, PARKHOUSE R M, PENEDOS A R, et al. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus [J]. J Gen Virol, 2007, 88 (Pt 9): 2426-2434.
- [20] GAUDREAU N N, RICHT J A. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus [J]. Vaccines, 2019, 7 (2): 56.
- [21] XU Z Y, HU Y F, LI J B, et al. Screening and identification of the dominant antigens of the African swine fever virus [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10: 1175701.