

吴植, 卢会鹏, 王安平, 等. 非洲猪瘟病毒无标签 p35 蛋白的制备及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1209-1216.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.05.013

## 非洲猪瘟病毒无标签 p35 蛋白的制备及间接 ELISA 抗体检测方法的建立

吴植, 卢会鹏, 王安平, 谢军, 曹世诺, 徐艳, 朱善元

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室/江苏现代畜牧与新兽药工程技术中心, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 为了进一步提高非洲猪瘟病毒 (ASFV) 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的特异性, 本研究构建了类弹性蛋白 (ELP) 标签与 ASFV p35 融合表达载体, 利用相变循环分离纯化融合蛋白后, 用烟草蚀纹病毒蛋白酶 (TEVP) 切除 ELP 标签, 制备获得无标签 p35 蛋白, 以此为包被抗原, 通过一系列的条件摸索和优化, 建立 ASFV 间接 ELISA 抗体检测方法。结果显示, ELP-p35 融合蛋白的相对分子质量大小约为 80 000; 制备获得的无标签 p35 蛋白能够被非洲猪瘟阳性血清所识别; 抗原包被最佳质量浓度为 2.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 待检血清最佳稀释比例为 1:200, 二抗最佳稀释比例为 1:10 000, 阴性和阳性判定阈值  $OD_{450}$  为 0.171; 与口蹄疫病毒 (FMDV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟疫病毒 (CSFV) 和伪狂犬病毒 (PRV) 等阳性血清无交叉反应, 特异性好; 批内、批间试验结果显示变异系数都小于 5.000%, 重复性好; 可检测 400 倍稀释的血清, 敏感性较高; 与商品化检测试剂盒 (ING) 检测结果的符合率高达 100%。结果表明, 用本研究制备的 ASFV 无标签 p35 蛋白作为包被抗原建立的间接 ELISA 方法可用于 ASFV 抗体的检测, 为该病的进一步精准检测提供了技术手段。

**关键词:** 非洲猪瘟; 类弹性蛋白; 无标签 p35 蛋白; 间接 ELISA 方法

中图分类号: S852.65<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)05-1209-08

## Preparation of tag-free p35 of African swine fever virus and development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) antibody detection method

WU Zhi, LU Hui-peng, WANG An-ping, XIE Jun, CAO Shi-nuo, XU Yan, ZHU Shan-yuan

(Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College/Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals/Engineering Technology Research Center for Modern Animal Science and Novel Veterinary Pharmaceutic Development, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** To further improve the specificity of indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method for detection of African swine fever virus (ASFV) antibody, fusion expression vector containing elastin-like polypeptide (ELP)

tag and ASFV p35 was constructed. After separating and purifying the fusion protein by inverse transition cycling, the tag-free p35 protein was obtained by cutting off the ELP tag by tobacco etch virus protease (TEVP). Using the purified recombinant protein as coating-antigen, the study aimed to establish an indirect ELISA method for detecting ASFV antibody through a series of condition exploration and purification. The results showed that, the relative molecular mass of ELP-p35 fusion protein was

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 泰州市科技支撑计划 (农业) 项目 (TN202001); 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点项目 (BE2020407); 科技部“科技助力经济 2020”重点专项 (SQ2020YFF0419717)

作者简介: 吴植 (1980-), 男, 江苏盐城人, 硕士, 副教授, 主要从事畜禽疫病防控技术研究。(Tel) 13951163801; (E-mail) yzwuzhi@163.com

通讯作者: 朱善元, (E-mail) jstzsy@126.com

80 000, and the obtained tag-free p35 protein could be recognized by positive serum of ASFV. It was found that the optimum antigen coating mass concentration was 2.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the optimum dilution rate for sera to be tested was 1 : 200, the optimum dilution rate for HRP-IgG was 1 : 10 000, and the cut-off value of  $OD_{450}$  was 0.171. The method showed no cross-reaction with positive sera of foot-and-mouth disease virus (FMDV), porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV) and pseudorabies virus (PRV), which showed high specificity. Coefficients of variation of the intra- and inter-assay were both <5.000% and showed good repeatability. Besides, the method could detect serum diluted 400 times, which showed high sensitivity. Compared with commercialized detection kits (ING), the coincidence rate of testing results of tag-free p35-ELISA method was 100%. The results indicated that the established indirect ELISA method by using tag-free p35 protein as coating antigen of ASFV can be applied in detection of ASFV-specific antibodies, which can provide technological tool for accurate detection of ASFV.

**Key words:** African swine fever; elastin-like polypeptide; tag-free p35 protein; indirect ELISA

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染可引起家猪和野猪高热和全身性出血,是一种高度接触性传染病,各种年龄家猪均易感,病死率可达 100%<sup>[1]</sup>。非洲猪瘟病毒最早于 1921 年在肯尼亚发现,随后蔓延至西欧、拉美等国家和地区<sup>[2]</sup>。2018 年 8 月首次传入中国,并迅速扩散于国内多个地区,给生猪养殖业造成了严重的经济损失<sup>[3-4]</sup>。

ASFV 呈 20 面体对称,其基因组为双股 DNA 分子,全长 170~194 kb,编码 150~200 个蛋白质,大部分为结构蛋白质,目前仍有一半以上的蛋白质功能尚不清楚<sup>[5-7]</sup>。除结构蛋白质外,病毒具有完整的酶系统<sup>[8]</sup>、编码免疫逃逸相关的蛋白质<sup>[9]</sup>、能够吸附红细胞<sup>[10-11]</sup>、侵害单核-巨噬细胞<sup>[12]</sup>等特点,以上病原学特点和感染特性给非洲猪瘟(ASF)的疫苗研制带来巨大挑战,至今尚无有效的疫苗问世。ASF 的防控以病原检测和扑杀为主。经过长时间的传播和流行,ASFV 在中国发生了不同形式的变异,出现了自然弱毒株与强毒株同时存在的新情况,致使感染猪出现超长潜伏期感染,给非洲猪瘟的精准剔除或“拔牙”增加了困难。因此监测 ASFV 感染抗体成为早期发现 ASF 的重要手段之一。研究结果表明,由 ASFV CP530R 基因编码的 pp62 蛋白具有较高的免疫原性<sup>[13]</sup>,感染猪后会产生较高水平的 pp62 抗体,通过间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 pp62 抗体能够快速准确地检测感染猪的情况。多聚蛋白 pp62 在病毒颗粒成熟过程中,被 S273R 蛋白酶水解切割为 p15 和 p35 2 个主要蛋白质<sup>[14]</sup>,p35 的释放是病毒颗粒成熟的重要标志<sup>[15]</sup>。

类弹性蛋白多肽(Elastin-like polypeptide, ELP)是一种五肽聚合物,具有对温度敏感、可逆相变特性,可作为纯化标签实现外源蛋白质的纯化<sup>[16]</sup>。本

研究将 p35 蛋白与 ELP 融合表达,利用可逆相变特性获得纯化蛋白质。为了减少假阳性,用烟草蚀纹病毒蛋白酶(TEVP)切除 ELP,获得无标签可溶性 p35 蛋白,建立间接 ELISA 检测方法,为 ASFV 病毒抗体精准检测提供了有效的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

感受态细胞 BL21(DE3)与 PCR 产物回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,DNA 质粒提取试剂盒购自安诺伦(北京)生物科技有限公司,连接酶、限制性内切酶和 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白质凝胶配制试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。ASFV 标准阳性血清购自国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心,商品化抗体检测试剂盒购自西班牙英吉纳公司。原核表达载体 pET-ELP 由本实验室构建并保存。

### 1.2 引物设计

参照 pUC-pp62 序列,设计上下游引物,上游引物序列(F)为:5'-AAGAAGGAGATATAGGTGAGCT-CCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTAACGACC-CCCCGTGCCCAA-3',下游引物序列(R)为:5'-GTGGTGCTGCTGCTGCTCGAGTTAAACCTTCTC-CTCGGGGAT-3'。斜体处分别是 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点序列,加粗处为 TEVP 酶切位点序列,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

### 1.3 pELP-p35 融合表达载体的构建与鉴定

以 p35 重组质粒为模板进行 PCR 扩增,回收 p35 基因片段。PCR 扩增体系为 30  $\mu\text{l}$ :p35 重组质粒 1  $\mu\text{l}$ ,上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ , 2 $\times$  PrimeSTAR Max

Premix 15  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序:98  $^{\circ}\text{C}$  2 min;98  $^{\circ}\text{C}$  10 s,56  $^{\circ}\text{C}$  10 s,72  $^{\circ}\text{C}$  10 s,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  2 min。用 *Sac* I 和 *Xho* I 分别双酶切 pET-ELP 与 p35 基因片段,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接回收产物,转化,提取阳性质粒进行双酶切鉴定。

#### 1.4 ELP-p35 融合蛋白的诱导表达与可逆相变循环(ITC)纯化

将 pELP-p35 转化 BL21(DE3),在营养琼脂平板(含 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素)上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜;挑取单克隆接种于 5 ml LB 培养基(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素)中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养活化;将重组菌液按体积比 1:100 接种于 200 ml 2 $\times$ YT 培养基(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素)中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 0.6~0.8 时,加入 0.2 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG),20  $^{\circ}\text{C}$  180 r/min 过夜诱导,同时设置对照;诱导结束后用超声波破碎仪将菌液破碎 10 min,直至液体清亮;将破碎后的菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 8 min,分别收集上清液、沉淀,沉淀用等量磷酸盐缓冲液(PBS)悬浮,各取 10  $\mu\text{l}$  进行 SDS-PAGE 电泳。在重组菌破碎离心的上清液中加入 6 mol/L NaCl 溶液,在 22  $^{\circ}\text{C}$ 、24  $^{\circ}\text{C}$ 、26  $^{\circ}\text{C}$ 、28  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,12 000 g 离心 10 min,分别取沉淀制样,进行 SDS-PAGE 分析,根据蛋白质条带大小确定 ITC 最佳温度;在重组菌上清液中分别加入不同浓度的氯化钠溶液至终浓度为 1.5 mol/L、2.0 mol/L、2.5 mol/L 和 3.0 mol/L,28  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,28  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 10 min,用 300  $\mu\text{l}$  TEVP 反应液重悬沉淀,进行 SDS-PAGE 分析,根据蛋白质条带含量大小确定可逆相变循环(ITC)纯化的氯化钠最佳浓度。

#### 1.5 无标签 p35 蛋白的制备与鉴定

纯化 ELP-p35 融合蛋白的相变循环参照文献[17]的方法进行,将重组菌裂解液与等量 6 mol/L NaCl 混匀,28  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,室温下 12 000 g 离心 5 min,沉淀用 TEVP 溶液重悬,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 10 min,收集上清液,取上清液 10  $\mu\text{l}$  进行 SDS-PAGE 电泳分析。标签 ELP 切割参考 Li 等<sup>[18]</sup>的方法进行,蛋白酶用量为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 36 h;4  $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 g 离心 10 min;与等量 6 mol/L NaCl 混合,28  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min;室温下 14 000 g 离心 5 min,离心后的上清液用 PBS(pH 7.2)透析 2 次,每次 2 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 g 离心 10 min,收集上清液即为纯化无标签重组 p35 蛋白。将切割回收的蛋

白质通过 SDS-PAGE 分离并转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,封闭后加入体积比 1:200 稀释的 ASFV 抗体阳性血清孵育 2 h,用含有吐温 20(Tween-20)的 Tris 盐缓冲液(TBST)洗涤 4 次,加入羊抗猪 IgG 二抗反应 45 min,TBST 洗膜 4 次后,滴加超敏发光液并置于化学发光仪内曝光。

#### 1.6 间接 ELISA 方法的建立

1.6.1 抗原最适质量浓度与血清最佳稀释度的确定 采用棋盘滴定方法,将不同质量浓度(8.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 p35 包被到酶标板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;用 TBST 洗涤 4 次,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h;按照 1:100、1:200、1:400、1:800 稀释倍比加入标准阴性血清、标准阳性血清,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  1 h,洗涤 4 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗猪 IgG(1:10 000),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后洗涤;加入四甲基联苯胺(TMB)显色反应 10 min;用 50  $\mu\text{l}$  稀硫酸终止反应,测定  $OD_{450}$ ;以标准阳性血清  $OD_{450}$  接近 1,阳性血清  $OD_{450}$  与阴性血清  $OD_{450}$  的比值( $P/N$  值)最大的孔蛋白质包被质量浓度和血清稀释度作为最适包被质量浓度和血清最佳稀释度。

1.6.2 其他反应条件的优化 以优化的最佳抗原包被质量浓度和血清稀释度,对包被液(去离子水、0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液、pH 7.2 PBS、0.05 mol/L pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液)、封闭液[5% 卵清蛋白(OVA)、5% 脱脂牛奶、5% 牛血清白蛋白、1% 明胶、1% 海藻糖]、血清稀释液(1% 脱脂牛奶、3% 脱脂牛奶、5% 脱脂牛奶)、酶标抗体稀释度(1:5 000、1:7 000、1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:40 000)和底物显色时间(5 min、10 min、15 min、20 min)等条件进行优化,每个反应设置 3 个重复孔,测定  $OD_{450}$ ,取其平均值。

1.6.3 阴性与阳性标准临界值的确定 以优化后的 p35-ELISA 检测条件对已知 143 份阴性血清进行检测,计算  $OD_{450}$  平均值( $\bar{x}$ )和标准差( $SD$ ),当  $OD_{450}$  大于等于  $\bar{x}+3SD$  时判定为阳性;小于  $\bar{x}+3SD$  时判定为阴性。

1.6.4 特异性试验 按照最优的检测条件,对口蹄疫病毒(FMDV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)和伪狂犬病毒(PRV)等抗体阳性血清进行特异性检

测,同时设置标准阴性血清对照和标准阳性血清对照,3次重复,测定  $OD_{450}$ ,取平均值,判断是否存在非特异性交叉反应,判定特异性。

**1.6.5 重复性试验** 按照最优的检测条件,用相同批次及不同批次制备的无标签 p53 蛋白作为包被抗原检测 6 份血清,其中阳性血清 5 份,阴性血清 1 份,每个样品重复 3 孔,测定  $OD_{450}$ ,取其平均值,计算批内试验和批间试验变异系数,分析重复性。

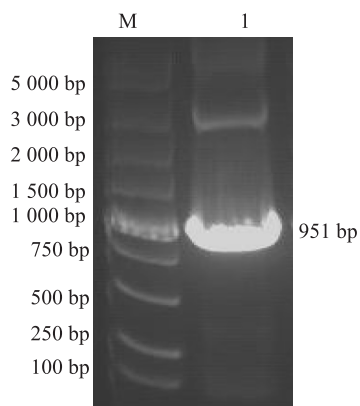
**1.6.6 敏感性试验** 在最优条件下,将标准阳性血清进行倍比稀释 800 倍,并设置阴性对照,根据检测结果判定评价 ELISA 方法的灵敏度。

**1.6.7 临床样品的检测** 应用建立的 p35 间接 ELISA 抗体检测方法对实验室保存的 103 份临床血清样品进行检测,并与 INGENASA 公司 ASFV 抗体检测试剂盒的检测结果进行比较,计算符合率。

## 2 结果与分析

### 2.1 ASFV p35 基因的扩增

从模板扩增特异性 p35 基因片段,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段的大小为 915 bp,主要包含 CP530R 基因序列 C 端的 478~1 383 bp、酶切位点序列、烟草蚀纹病毒蛋白酶 (*TEVP*) 酶切位点序列和保护性碱基等,与预期大小一致,结果见图 1。



M:DL5 000 Marker;1:p35 扩增片段。

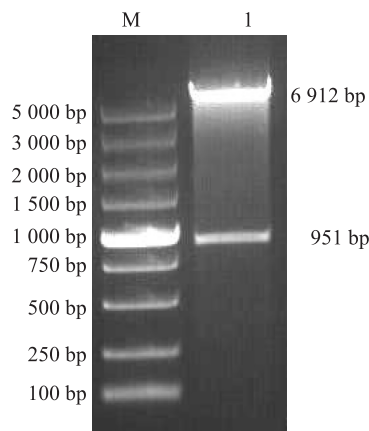
图 1 p35 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of p35

### 2.2 融合表达载体的鉴定

将 p35 基因片段定向克隆至 pET-ELP,构建融合重组表达质粒 pET-ELP-p35,经过 *Sac* I + *Xho* I 双酶切后,获得预期大小的 2 个片段,即 951 bp 和 6 912 bp,表明重组质粒 pET-ELP-p35 构建正确,结

果见图 2。



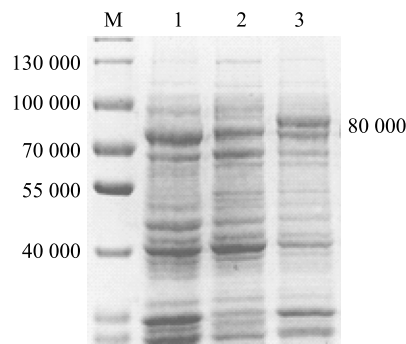
M:DL5 000 Marker;1:pET-ELP-p35 经 *Sac* I + *Xho* I 双酶切。

图 2 重组载体 pET-ELP-p35 双酶切鉴定

Fig.2 Identification of pET-ELP-p35 by double enzyme digestion

### 2.3 融合蛋白的表达与 ITC 纯化

SDS-PAGE 凝胶电泳结果 (图 3) 显示,重组菌出现相对分子质量为 80 000 的蛋白质条带,与预期大小相符,且在上清液中获得表达。ELP-p35 融合蛋白 ITC 的最佳孵育温度为 28 ℃ (图 4)。ITC 纯化的最佳 NaCl 浓度为 4 mol/L (图 5)。



M:蛋白质 Marker;1:pET-ELP 空载体对照;2:未诱导的 pET-ELP-p35;3:诱导的 pET-ELP-p35。

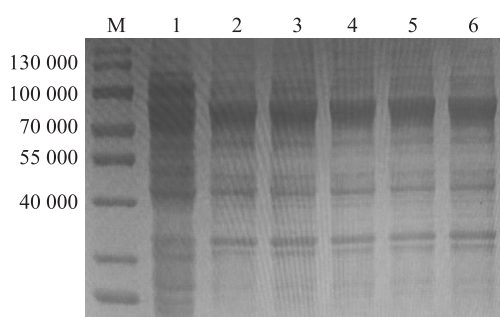
图 3 融合蛋白 ELP-p35 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定

Fig.3 Identification of fusion protein ELP-p35 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

### 2.4 无标签重组 p30 蛋白纯化与免疫印迹鉴定

将烟草蚀纹病毒蛋白酶按一定比例加入纯化的 ELP-p35 融合蛋白溶液中,在水浴锅中 30 ℃ 孵育切割 ELP 标签,12 000 r/min 离心 10 min 去除 *TEVP*,在上清液中加入对应体积的 4 mol/L NaCl,28 ℃ 孵

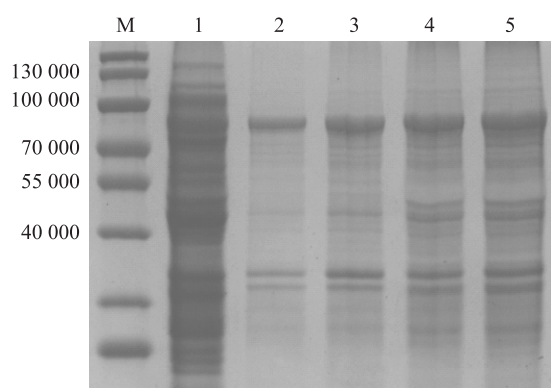




M: 蛋白质 Marker; 1: 未纯化; 2: 22 °C; 3: 24 °C; 4: 26 °C; 5: 28 °C; 6: 30 °C。

图 4 可逆相变循环 (ITC) 温度优化

Fig.4 Optimization for temperature of inverse transition cycling (ITC)



M: 蛋白质 Marker; 1: 未纯化; 2: 3 mol/L; 3: 4 mol/L; 4: 5 mol/L; 5: 6 mol/L。

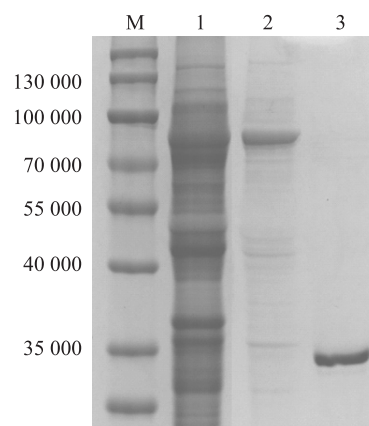
图 5 可逆相变循环 (ITC) NaCl 离子浓度优化

Fig.5 Optimization for salt ion concentration of inverse transition cycling (ITC)

育 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液透析至 PBS (pH 7.2), SDS-PAGE 分析结果 (图 6) 显示, 经纯化后获得可溶性无标签 p35 重组蛋白。用非洲猪瘟抗体阳性猪血清通过免疫印迹鉴定 (Western Blot) 检测重组 p35 蛋白, 结果显示切割后的 p35 重组蛋白能被非洲猪瘟抗体特异性识别 (图 7)。

## 2.5 间接 ELISA 条件的确定

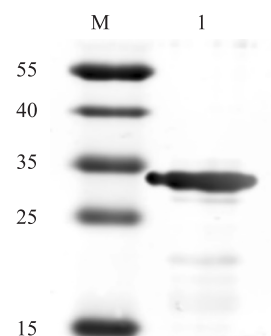
2.5.1 重组蛋白质包被质量浓度和待检样品稀释度的确定 通过方阵滴定试验可知, 当无标签 p35 蛋白包被质量浓度为 2.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 待检血清按 1:200 稀释时, 此时  $P/N$  值 (1.514/0.091) 最大, 且此时阳性血清  $OD_{450} > 1$ , 所以确定 2.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  为最适包被质量浓度, 血清最适稀释比例



M: 蛋白质 Marker; 1: 未纯化; 2: ELP-p35 ITC 纯化; 3: 无标签 p35 蛋白。

图 6 ELP-p35 融合蛋白标签切除回收十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

Fig.6 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of tag cleavage and recovery of fusion protein ELP-p35



M: 蛋白质 Marker; 1: p35 蛋白。

图 7 重组蛋白质 p35 的 Western-blot 鉴定

Fig.7 Western-blot identification of p35 protein

为 1:200 (表 1)。

2.5.2 其他条件的优化 根据  $P/N$  值的大小确定包被液为 0.05 mol/L、pH 9.6 碳酸盐缓冲液, 封闭液为 5% 脱脂牛奶, 血清稀释液为 5% 脱脂牛奶, 二抗稀释比例为 1:10 000, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色时间为 10 min。

2.5.3 临界值的确定 在最优化条件下, 对已知的 143 份阴性血清进行检测, 同时设置已知的 ASFV 抗体阳性样品作为对照, 阴性血清样本  $OD_{450}$  的平均值 ( $\bar{x}$ ) 为 0.081, 标准误 ( $SD$ ) 为 0.03, 则血清阴性和阳性判定阈值  $OD_{450}$  为 0.171, 即待测血清  $OD_{450} > 0.171$

为阳性,待测血清 $OD_{450} \leq 0.171$  为阴性。

2.5.4 批内、批间重复试验 批内重复试验结果(表 2)显示,变异系数为0.348%~3.757%;批间重

复试验结果显示,变异系数为0.320%~2.040%,变异系数均小于 5.000%,表明建立的 ELISA 方法重复性良好。

表 1 无标签 p35 蛋白包被质量浓度和血清稀释度的确定

Table 1 Determination of the coating mass concentration of tag-free p35 protein and sera dilution

样品	稀释比例	不同包被抗原质量浓度的阳性血清 $OD_{450}$ 与阴性血清 $OD_{450}$ 比值					
		8.00 ( $\mu\text{g/ml}$ )	4.00 ( $\mu\text{g/ml}$ )	2.00 ( $\mu\text{g/ml}$ )	1.00 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.25 ( $\mu\text{g/ml}$ )
阳性样品	1 : 100	1.632	1.446	1.627	1.436	1.136	0.648
	1 : 200	1.123	1.038	1.514	1.102	0.823	0.412
	1 : 400	0.923	0.947	0.913	0.643	0.535	0.411
	1 : 800	0.665	0.588	0.532	0.538	0.426	0.379
阴性样品	1 : 100	0.131	0.126	0.118	0.106	0.093	0.082
	1 : 200	0.113	0.096	0.091	0.085	0.091	0.063
	1 : 400	0.095	0.081	0.081	0.081	0.085	0.062
	1 : 800	0.092	0.063	0.072	0.076	0.073	0.056

表 2 批内重复和批间重复试验

Table 2 intra-assay and inter-assay of repeatability

样品	批内重复试验			批间重复试验		
	平均值	标准差	变异系数(%)	平均值	标准差	变异系数(%)
A	0.862	0.003	0.348	0.839	0.010	1.192
B	0.445	0.013	2.921	0.469	0.003	0.640
C	0.667	0.003	0.450	0.682	0.011	1.613
D	0.112	0.003	2.679	0.098	0.002	2.040
E	0.692	0.026	3.757	0.622	0.002	0.322
F	1.008	0.004	0.397	0.937	0.003	0.320

A~F 为血清代号,其中 D 为阴性血清,其余为阳性血清。

2.5.5 敏感性试验 在最优条件下,对倍比稀释的标准阳性血清进行 ELISA 抗体检测,结果显示,当按1 : 400 稀释时 $OD_{450} > 0.171$ ,说明该方法有较好的灵敏度。

2.5.6 特异性试验 在优化条件下,检测 CSFV、PRRSV、FMDV、PCV2 和 PRV 的阳性血清,结果(表 3)显示,建立的以 p35 为包被抗原的检测结果均为阴性,表明该方法特异性好。

2.5.7 临床样品的检测 利用本研究建立的 p35 间接 ELISA 抗体检测方法,与商品化非洲猪瘟抗体检测试剂盒(ING)分别对 103 份临床血清样品进行检测。检测结果均为阴性(表 4),与商品化试剂盒

检测结果相比,两者的符合率为 100%。

表 3 特异性试验

Table 3 Specificity assay

病毒	$OD_{450}$	结果
PCV2	0.068	-
PRV	0.075	-
CSFV	0.095	-
PRRSV	0.085	-
FMDV	0.071	-
阴性对照	0.082	-
阳性对照	1.113	+

-: 阴性;+: 阳性。PCV2:猪圆环病毒 2 型;PRV:伪狂犬病毒;CSFV:猪瘟疫病毒;PRRSV:猪繁殖与呼吸综合征病毒;FMDV:口蹄疫病毒。

表 4 与商品化试剂盒的比对试验

Table 4 Compare test with commercial kits

方法	结果	ING		小计
		阳性	阴性	
p35 iELISA	阳性	0	0	0
	阴性	0	103	103
	小计	0	103	103

ING: 商品化检测试剂盒; iELISA: 间接酶联免疫吸附试验。

### 3 讨论

目前,非洲猪瘟仍然是危害中国养猪业的重要传染病,造成了极大的经济损失。当前该病防控最主要的困扰是仍未有有效的疫苗,主要依靠检测、监测和扑杀来综合防控。当前病原学检测大多依靠普通 PCR 和荧光定量 PCR 方法,但当前中国非洲猪瘟出现了新的流行特点,主要表现为由急性发病转变为缓慢发病、出现隐性感染或耐过猪<sup>[19]</sup>和不定期排毒,这给病原的核酸检测带来了很大的不确定性。而猪可在感染后 7~9 d 产生抗体,血清学抗体检测成为可靠的检测、监测手段。研究结果表明,ASFV pp62 蛋白具有强抗原性,在感染猪体内相应的抗体滴度较高,可作为抗原建立相应的血清学检测方法,用于 ASFV 的抗体检测<sup>[20]</sup>。在病毒颗粒成熟的过程中,pp62 被 S273R 蛋白酶水解切割为 p15、p35, p15 和 p35 蛋白存在于成熟病毒颗粒的内膜,因此针对水解产物 p15 和 p35 蛋白开展抗体检测、监测更能够反映病毒感染的实际水平。本研究为了评估 p35 蛋白作为 ELISA 血清学诊断抗原的可行性,选用 p35 作为包被抗原来建立 ELISA 检测方法。

当前研发的各种亚单位疫苗在中国大部分猪场被广泛应用,亚单位疫苗在研制过程中都会将抗原基因与纯化标签融合表达,这样猪群经过多次免疫后,会产生相应的抗多聚组氨酸抗体。同时在 ELISA 抗体检测方法建立的过程中,往往为了纯化目的蛋白的方便,用于检测包被的抗原大多数是与组氨酸的标签融合表达<sup>[21-23]</sup>。用这样的检测方法去开展临床猪群血清样品的检测,往往会出现假阳性的检测结果。为了消除影响,本研究选用 p35 与 ELP 融合表达,并在 ELP 和 p35 蛋白之间插入了 TEVP 切割位点,利用 ELP 相变特性纯化融合蛋白后,通过 TEVP 切割可获得无标签的 ASFV 抗原。

与于学祥等<sup>[24]</sup>制备的无标签 ASFV p30 蛋白相比,本研究不需要经过包涵体的变性和镍柱亲和层析纯化等复杂步骤,利用 ELP 标签具有温度敏感的可逆相变特性,通过升温、降温、离心和洗涤等步骤即可获得抗原蛋白,纯化过程不仅简单,而且经济实惠,最后得到了纯度较高的无标签 p35 蛋白,为使用该蛋白质作为包被抗原建立 ELISA 检测方法奠定了良好的基础。

本研究参考 ASFV SY18 毒株 (GenBank: MH713612.1) 的 p35 基因,该毒株是中国的流行毒株,在此基础上建立的 ELISA 抗体检测方法更具有针对性。建立的间接 ELISA 抗体检测方法对 FMDV、PCV2、PRRSV、CSFV 和 PRV 均无交叉反应,可检测稀释 400 倍的阳性血清,组间重复试验和组内重复试验变异系数均小于 5.000%,该检测方法具有特异性好、敏感性高和重复性好的特点,且与非洲猪瘟商品化抗体检测进口试剂盒(ING)检测结果的符合率高达 100%。

本研究成功制备了无标签 p35 重组蛋白,并以此建立了 ASFV 抗体 ELISA 检测方法,为非洲猪瘟的检测、监测提供了更精准的技术工具。

### 参考文献:

- [1] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, et al. ICTV virus taxonomy profile: asfarviridae [J]. Journal Of General Virology, 2018, 99 (5): 613-614.
- [2] DIXON L K, SUN H, ROBERTS H. African swine fever [J]. Antiviral Research, 2019, 165: 34-41.
- [3] GE S Q, LI J M, FAN X F, et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24 (11): 2131-2133.
- [4] ZHOU X, LI N, LUO Y, et al. Emergence of African swine fever in China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65 (6): 1482-1484.
- [5] DE VILLIERS E P, GALLARDO C, ARIAS M, et al. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences [J]. Virology, 2010, 400 (1): 128-136.
- [6] DIXON L K, CHAPMAN D A, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. Virus Research, 2013, 173 (1): 3-14.
- [7] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle [J]. Journal of Virology, 2018, 92 (23): e01293.
- [8] EULÁLIO A, NUNES-CORREIA I, SALAS J, et al. African swine fever virus p37 structural protein is localized in nuclear foci containing the viral DNA at early post-infection times [J]. Virus Research, 2007, 130 (1/2): 18-27.

- [9] DIXON L K, ABRAMS C C, BOWICK G, et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 100(3/4): 117-134.
- [10] WANG G G, XIE M J, WU W, et al. Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2124.
- [11] QUINTERO J C, WESLEY R D, WHYARD T C, et al. *In vitro* and *in vivo* association of African swine fever virus with swine erythrocytes[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1986, 47(5): 1125-1131.
- [12] FRANZONI G, GRAHAM S P, GIUDICI S D, et al. Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 198: 88-98.
- [13] 郭怡德, 李冰, 蔡汝健, 等. 非洲猪瘟病毒蛋白功能研究进展[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(10): 96-101.
- [14] 储珩, 赵普, 张婕妮, 等. 非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(5): 579-585.
- [15] 欧云文, 刘俐君, 贾宁, 等. 非结构蛋白在非洲猪瘟病毒感染中作用[J]. *病毒学报*, 2021, 37(4): 910-921.
- [16] 李景生, 徐军, 刘陶莹, 等. 类弹性蛋白多肽及其应用研究进展[J]. *生物技术世界*, 2015(6): 16-17.
- [17] LIU W J, WU Q, XU B, et al. Single-step purification of recombinant proteins using elastin-like peptide-mediated inverse transition cycling and self-processing module from *Neisseria meningitidis* FrpC[J]. *Protein Expression And Purification*, 2014, 98: 18-24.
- [18] LI G Y, XIAO Z Z, LU H P, et al. A simple method for recombinant protein purification using self-assembling peptide-tagged tobacco etch virus protease[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 128: 86-92.
- [19] 肖景景, 卢会鹏, 李洋洋, 等. 非洲猪瘟病毒无标签重组 K205R 抗原制备与应用[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2019, 40(3): 90-94, 100.
- [20] ZHONG K, ZHU M, YUAN Q, et al. Development of an indirect ELISA to detect African swine fever virus pp62 protein-specific antibodies[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 8: 798559.
- [21] 吴竞, 王西西, 吴映彤, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 基因的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(12): 3555-3562.
- [22] 庚辛, 孙明霞, 王淑杰, 等. 非洲猪瘟病毒 p72 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(9): 946-951.
- [23] 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[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 187-195.
- [24] 于学祥, 陈晓雨, 李栋凡, 等. 非洲猪瘟病毒无标签 p30-ELISA 抗体检测方法的建立及应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(5): 1517-1526.

(责任编辑: 陈海霞)