

周俊明, 倪艳秀, 范宝超, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白氨基酸序列分段表达及反应原性分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1875-1881.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.012

# 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白氨基酸序列分段表达及反应原性分析

周俊明, 倪艳秀, 范宝超, 祝昊丹, 朱雪蛟, 王丹丹, 胡屹屹, 李彬  
(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为比较非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)p30 蛋白氨基酸序列中不同片段的反应原性, 探究 p30 蛋白氨基酸序列中可能的抗原优势片段。本研究通过 PCR、克隆技术将 p30 蛋白氨基酸序列中不同片段的编码基因分别插入表达质粒 pET32a, 经 IPTG 诱导、Ni 柱纯化、透析后, 获得 p30 蛋白氨基酸序列中 8~101 aa 片段(P-1#)、58~101 aa 片段(P-2#)、101~158 aa 片段(P-3#)、8~194 aa 片段(P-4#), 用酶联免疫吸附试验(ELISA)分析 p30 蛋白氨基酸序列中不同片段与 p30 蛋白免疫血清和 ASFV 阳性猪血清的反应原性。结果显示, 上述片段均获得诱导表达及纯化, 表达形式有可溶性表达(P-1#、P-3#)和包涵体表达(P-2#、P-4#)。各片段以 1.0 mg/L 包被时, p30 免疫血清与 p30 蛋白氨基酸序列中 4 种片段均能发生免疫反应, ASFV 阳性猪血清与 P-4#、P-1# 反应较佳, 与 P-3# 反应中等, 与 P-2# 反应最弱。综上, p30 蛋白氨基酸序列中不同片段反应原性的差异为认识 p30 抗原优势区域提供了数据, 这将有助于非洲猪瘟血清学诊断抗原的科学筛选。

**关键词:** 非洲猪瘟病毒; p30 蛋白; 氨基酸序列片段; 反应原性

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)10-1875-07

## Expression and reactogenicity analysis of the truncated amino acid sequence of p30 protein in African swine fever virus

ZHOU Junming, NI Yanxiu, FAN Baochao, ZHU Haodan, ZHU Xuejiao, WANG Dandan, HU Yiyi, LI Bin  
(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to compare the reactogenicity of different fragments of the p30 protein amino acid sequence of African swine fever virus (ASFV), and to explore the possible antigen-dominant fragments in the p30 protein amino acid sequence. In this study, the coding genes of different fragments of p30 amino acid sequence were inserted into the expression plasmid pET32a by PCR and cloning techniques. After IPTG induction, Ni column purification and dialysis, 8-101 aa fragment (P-1#), 58-101 aa fragment (P-2#), 101-158 aa fragment (P-3#) and 8-194 aa fragment (P-4#) in the amino acid sequence of p30 protein were obtained. The reactogenicity of different fragments of p30 protein

收稿日期: 2023-12-11

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2022YFD1800601); 国家自然科学基金项目(31941013); 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(21)3137 ]; 河北省省级科技计划资助项目(21322401D); 苏北科技专项(SZ-LYG202109)

**作者简介:** 周俊明(1983-), 男, 江苏东台人, 硕士, 副研究员, 主要从事动物传染病防治和诊断技术研究。(Tel) 025-84390988; (E-mail) zhoujm075@163.com

**通讯作者:** 李彬, (E-mail) libinana@126.com

amino acid sequence with p30 protein immunized rabbit serum and ASFV positive pig serum was analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the above fragments were induced and purified. The expression forms were soluble expression (P-1#, P-3#) and inclusion body expression (P-2#, P-4#). When each fragment was coated at 1.0 mg/L, the p30 immunized rabbit serum and the four fragments in the amino acid sequence of p30 protein could react with each other.

The reaction of ASFV-positive pig serum with P-4# and P-1# was better, with P-3# was moderate, and with P-2# was the weakest. In summary, the differences in the reactogenicity of different fragments in the amino acid sequence of p30 protein provide data for understanding the dominant fragments of p30 antigen, which will help the scientific screening of serological diagnostic antigens of African swine fever.

**Key words:** African swine fever virus; p30 protein; amino acid sequence fragment; reactogenicity

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (ASFV) 引起的一种高度致死性传染病, 可感染不同日龄和品种的家猪和野猪<sup>[1]</sup>, 临床表现急性出血热、皮肤斑点, 剖检有淋巴结和内脏器官出血等症状<sup>[2]</sup>。ASF 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为法定报告动物疫病, 2018 年 8 月, 首次报道了非洲猪瘟病毒基因 II 型毒株传入中国, 在短短 6 个月内, 高致死率的急性非洲猪瘟在中国大多数省份迅速传播, 给中国养猪业造成了巨大损失<sup>[3]</sup>; 2020 年报道非洲猪瘟病毒出现了低毒力基因 II 型毒株<sup>[4]</sup>; 2021 年出现非洲猪瘟基因 I 型毒株, 该毒株可引起猪慢性感染<sup>[5]</sup>, 上述低致病力毒株的出现给非洲猪瘟的防控带来新的挑战。

国际病毒分类委员会将 ASFV 归为非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属, ASFV 含有双层囊膜, 基因组全长 170~193 kb, 包含 151~167 个基因<sup>[6]</sup>, 基因组中间区域较为保守, 不同 ASFV 毒株之间的基因组差异主要来源于基因组末端多基因家族的不同<sup>[7]</sup>。有研究利用原核表达系统表达了 35 种 ASFV 结构蛋白, 并利用 ASFV 阳性猪血清评估这些蛋白的抗原性, 结果显示, 感染 ASFV 后 p30 蛋白诱发的免疫反应早且明显<sup>[7]</sup>。p30 定位于 ASFV 囊膜的内膜, 由基因 *CP204L* 编码, 主要参与了 ASFV 与靶细胞结合以及内化<sup>[8-9]</sup>, 目前已有较多研究利用 p30 单克隆抗体解析 p30 的抗原信息, 以及表达 p30 全长蛋白建立 ASFV 抗体检测方法, 但大部分原核表达获得的 p30 蛋白是以包涵体形式存在的。本研究拟开展 p30 蛋白氨基酸序列不同片段的原核表达, 并分析 p30 蛋白不同区域的表达形式以及免疫反应特性, 进一步丰富对 p30 抗原特性的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体、重组菌、蛋白和血清

p30 重组表达质粒 pET28a-p30 (1~194 位氨基酸)、表达载体 pET-32a(+)、硫氧还蛋白 (TRX)、pET32a-p30 (8~101 位氨基酸) 重组菌、pET28a-p30

纯化重组蛋白均由江苏省农业科学院兽医研究所保存<sup>[10]</sup>; 非洲猪瘟阳性猪血清购自中国兽医药品监察所。

### 1.2 主要试剂

PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、限制性核酸内切酶 *Bam* H I 和 *Sal* I、DNA Ligation Kit 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 羊抗兔 IgG-HRP、硫酸卡那霉素溶液、10×PBS 缓冲液、溶菌酶、Tween 20 购自北京索莱宝科技有限公司; HisTrap HP 预装柱购自 Cytiva 公司; HRP 标记羊抗猪 IgG (H+L) 购自 Bethyl 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; IPTG 溶液、即用型氨苄青霉素钠溶液均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 预染蛋白 Marker 购自 GeneDireX 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自 Omega 公司。

### 1.3 兔 p30 多克隆抗体的制备

取适量纯化的 pET28a-p30 重组蛋白与弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂分别进行乳化, 蛋白质与佐剂体积比为 1:1, 乳化后 p30 蛋白质量浓度为 1 g/L。取 3 只体重 3 kg 的普通级新西兰兔 (购自南京市青龙山动物繁殖场), 分别皮下分点注射 1 mL 经弗氏完全佐剂乳化的 p30 蛋白, 首次免疫后 14 d 和 28 d, 分别取经弗氏不完全佐剂乳化的 p30 蛋白, 同上进行皮下免疫。首次免疫前 7 d 和末次免疫后 7 d, 分别采集兔血, 分离出血清, 分装后在 -20 °C 条件下保存备用。

### 1.4 编码 p30 蛋白不同区域基因序列的克隆、转化

按重组质粒 pET28a-p30 中 p30 优化编码基因序列, 设计系列引物, 分别进行 PCR 扩增 p30 蛋白 58~101 位、101~158 位、8~194 位氨基酸序列的编码基因序列, 扩增引物序列见表 1; 随后将各 PCR 扩增片段进行胶回收, 利用限制性核酸内切酶 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切回收 PCR 片段, 分别以连接酶连接表达载体 pET-32a(+), 连接产物分别转化入感受

态 BL21 (DE3), 经限制性核酸内切酶 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定阳性重组菌, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将实验室保存的 pET32a-p30 (8~101) 重组菌以及新构建的表达 p30 蛋白不

同氨基酸序列片段的重组菌 pET32-p30 (58~101)、pET32-p30 (101~158)、pET32-p30 (8~194) 分别命名为 1#、2#、3#、4#。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 Sequences of primers used for PCR amplification

引物名称	引物序列(5'→3')	酶切位点	产物大小(bp)
p30(58~101)-F	CCGGATCCGTGAAATATGATATCG	<i>Bam</i> H I	151
p30(58~101)-R	AAGTCGACTTAGCTGCTCGCGCTGCTTT	<i>Sal</i> I	
p30(101~158)-F	CCGGATCCGAGAACATTCACGAGAAG	<i>Bam</i> H I	190
p30(101~158)-R	GGGTCGACTTAGTTGAAATCCGGCG	<i>Sal</i> I	
p30(8~194)-F	GCGGATCCATGAAAATGGAAGTG	<i>Bam</i> H I	577
p30(8~194)-R	GGGTCGACTTACTTTTCTTCAGCAGC	<i>Sal</i> I	

## 1.5 蛋白质表达及纯化

将 4 种重组菌进行体外扩大培养, 按 1% 的比例接种至 200 mL 的 LB 液体培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素钠)中, 37 ℃, 220 r/min 振荡培养至细菌液  $OD_{600}$  值达到 0.5 左右时, 加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 37 ℃, 220 r/min 继续振荡培养 4 h, 10 000 r/min 离心收集菌体, 加入 10 mL 1×PBS 重悬菌体, 再加入终浓度为 0.2 g/L 的溶菌酶, 混匀后冰上孵育 30 min, 以 300 W, 5 s 超声, 10 s 间歇的条件, 超声波破碎上述细菌混悬液, 10 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, 沉淀以变性缓冲液(8 mol/L 尿素、20 mmol/L 磷酸二氢钠、500 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 咪唑、pH 7.4)溶解, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液(包涵体蛋白)。收集诱导前菌体蛋白、诱导后菌体超声上清液、诱导后菌体超声沉淀样品各 16  $\mu$ L, 加入 4  $\mu$ L 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀, 沸水浴 10 min, 处理后样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分析不同重组蛋白的表达形式。收集 PBS 重悬的各诱导后的菌体, 同上处理样品并进行免疫印迹试验(Western blot), 分析各重组菌诱导蛋白质与 His 单抗的反应原性。随后参照 HiTrap HP 亲和层析柱说明书, 纯化 4 种重组蛋白, 以 1×PBS 作为缓冲液透析处理纯化蛋白质, 随后 NanoDrop 分析蛋白质含量, 调整含量后取适量重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

## 1.6 ELISA

以包被液(100 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ 、46 mmol/L

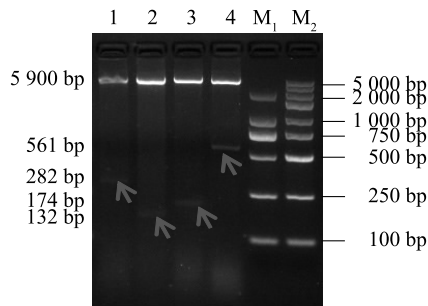
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、pH 9.6)将各纯化的重组蛋白及硫氧还蛋白分别稀释至 1.0 mg/L 和 0.1 mg/L, 每孔 100  $\mu$ L, 分别加入 96 微孔板中, 4 ℃ 包被过夜; 弃去抗原液, 用 PBST (1×PBS, 含 0.05% Tween 20) 洗涤 5 次, 每孔 300  $\mu$ L, 每次 10 s, 加入 PBST (含 5% 脱脂奶粉) 封闭, 每孔 300  $\mu$ L, 37 ℃ 孵育 2 h; 弃去孵育液, 同上洗涤, 用 PBST (含 2% 脱脂奶粉) 分别稀释 p30 免疫兔血清或非洲猪瘟阳性猪血清(按体积比 1:40、1:80、1:160、1:320 稀释), 同时设立 40 倍稀释的兔免疫 p30 前血清或 ASFV 抗体阴性猪血清分别作为阴性对照, 每孔 100  $\mu$ L, 加入 96 微孔板, 37 ℃ 孵育 30 min, 弃去血清, 同上洗涤, 加入 1:10 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔二抗或 HRP 标记羊抗猪二抗, 每孔 100  $\mu$ L, 在 37 ℃ 条件下作用 30 min, 弃去二抗, 同上洗涤, 每孔加入 50  $\mu$ L 单组分 TMB 显色液, 37 ℃ 避光作用 10 min, 最后加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 每孔 50  $\mu$ L, 终止反应, 用酶标仪读  $OD_{450}$  值, 计算样品  $OD_{450}$  (S-N) 值[样品  $OD_{450}$  (S-N) 值=样品  $OD_{450}$  - 阴性血清  $OD_{450}$ ]。试验重复 2 次, 计算平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒鉴定

提取重组菌 1#、2#、3#、4# 重组质粒, 经 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示, 均获得约 5 900 bp 的 pET32a 载体片段, 同时分别产生 282 bp、132 bp、174 bp 和 561 bp 的插入片

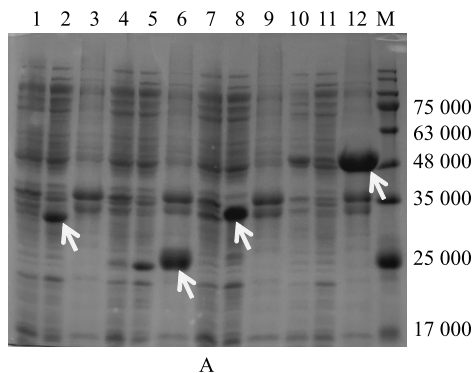
段,与预期目的片段长度相符,结果见图 1。经测序,各载体中插入碱基序列编码的多肽氨基酸序列均包含有 Pig/HLJ/2018 毒株的 CP204L 蛋白氨基酸序列(GenBank QBH90581.1)。



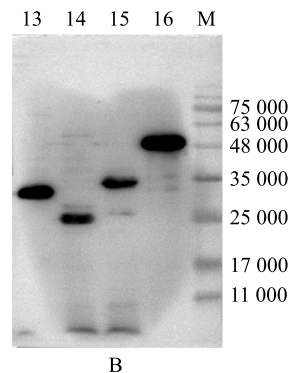
1,2,3,4 分别代表重组菌 1#、2#、3#、4# 的重组质粒经 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切;M<sub>1</sub> 代表 DL2 000 bp Marker;M<sub>2</sub> 代表 DL5 000 bp Marker。

图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmids by digestion of *Bam* H I and *Sal* I



A



B

A 为 SDS-PAGE 分析重组蛋白表达形式;B 为 Western blot 分析。1、4、7、10 分别为 IPTG 诱导前重组菌 1#、2#、3#、4# 菌体蛋白质;2、5、8、11 分别为 IPTG 诱导 4 h 后重组菌 1#、2#、3#、4# 菌体上清液中蛋白质;3、6、9、12 分别为 IPTG 诱导 4 h 后重组菌 1#、2#、3#、4# 菌体包涵体中蛋白质;13、14、15、16 分别为 IPTG 诱导后的重组菌 1#、2#、3#、4# 全菌蛋白质;M 为蛋白质 Marker。

图 2 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白片段原核表达及鉴定

Fig.2 Prokaryotic expression and identification of African swine fever virus p30 protein fragments

## 2.4 p30 蛋白氨基酸序列不同片段的反应原性

将纯化、透析后的 4 种重组蛋白氨基酸序列片段分别稀释至 1.0 mg/L 和 0.1 mg/L 进行包被,与不同稀释浓度下的 ASFV 阳性猪血清或 p30 免疫兔血清进行 ELISA 反应,结果显示 2 种蛋白质浓度包被下 P-1# 和 P-4#,与 40 倍稀释 ASFV 阳性猪血清均有较好的免疫反应,随着血清稀释度增加,其 ELISA 反应  $OD_{450}(S-N)$  值均显示出下降趋势;2 种蛋白质浓度包被的 P-2#,与 40 倍稀释的 ASFV 阳性猪血清

## 2.2 重组蛋白氨基酸序列片段诱导表达和鉴定

经过 IPTG 诱导, pET32a-p30 (8~101)、pET32-p30 (58~101)、pET32-p30 (101~158)、pET32-p30 (8~194) 分别表达获得相对分子量 32 000、25 000、33 000、50 000 的重组蛋白氨基酸序列片段,分别命名为 P-1#、P-2#、P-3#、P-4#,SDS-PAGE 分析显示,P-1# 和 P-3# 表达在诱导细菌超声波破碎的上清液中,P-4# 表达在包涵体中,P-2# 表达在上清液和包涵体中,但以表达在包涵体中为主(图 2A)。诱导后的 4 种重组菌,与 His 单克隆抗体均有对应的特异性反应条带(图 2B)。

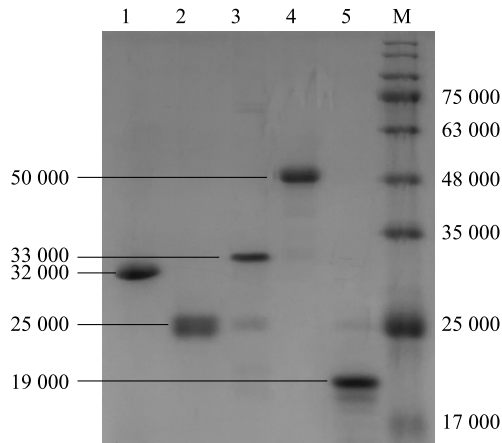
## 2.3 重组蛋白氨基酸序列片段纯化

分别将表达在上清液中的 P-1# 和 P-3# 和表达在包涵体中的 P-2# 和 P-4# 进行 Ni 柱纯化,SDS-PAGE 显示,获得 4 种纯化的 p30 重组蛋白氨基酸序列片段,各相对分子量符合预期(图 3)。

ELISA 反应  $OD_{450}(S-N)$  值均较低,提示 P-2# 的抗原较弱。

由图 4 可见,4 种重组蛋白氨基酸序列片段以 1.0 mg/L 进行包被,与系列稀释的 p30 免疫兔血清均有较好的免疫反应,随着血清稀释度增加,P-2# 和 P-3# 的 ELISA 反应  $OD_{450}(S-N)$  值略有下降;当蛋白质包被浓度为 0.1 mg/L 时,P-2# 与 p30 免疫兔血清反应最弱,随着血清稀释度增加,P-3# 的 ELISA 反应  $OD_{450}(S-N)$  值显示出下降趋势,而 P-1# 和 P-4#

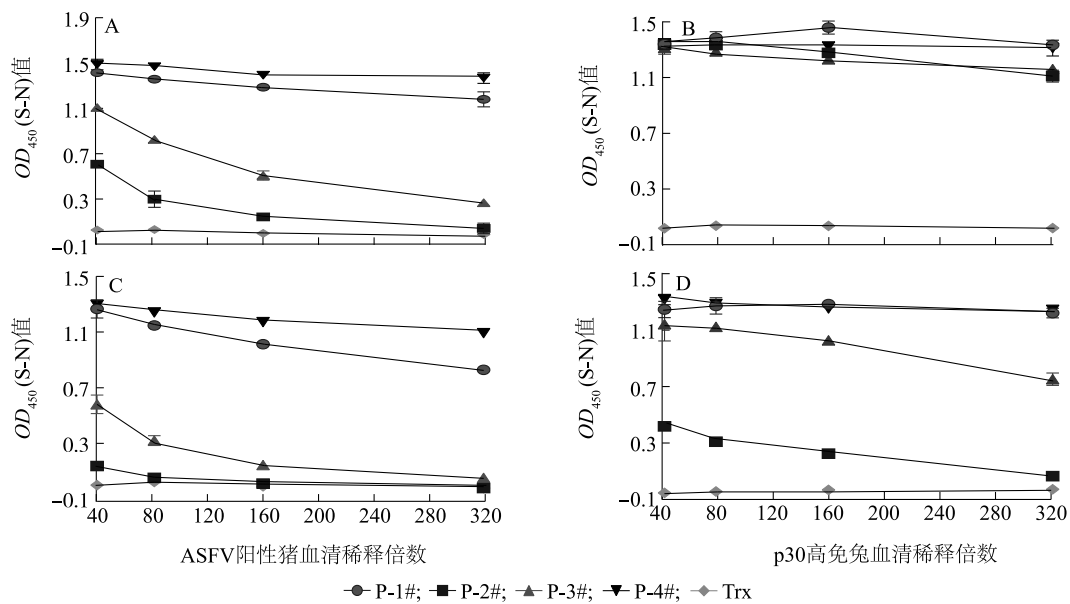




1,2,3,4 分别代表 Ni 柱纯化后的重组蛋白 P-1#、P-2#、P-3#、P-4#;5 代表硫氧还蛋白 (Trx);M 代表蛋白质 Marker。

图3 纯化的 p30 重组蛋白氨基酸序列片段 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the amino acid sequence of the purified p30 recombinant protein



A、B 分别代表包被蛋白质浓度为 1.0 mg/L, C、D 分别代表包被蛋白质浓度为 0.1 mg/L。P-1#、P-2#、P-3#、P-4# 分别代表 pET32a-p30 (8~101)、pET32-p30 (58~101)、pET32-p30 (101~158)、pET32-p30 (8~194) 诱导表达纯化的重组蛋白氨基酸序列片段。

图4 ELISA 分析 4 种 p30 蛋白氨基酸序列片段与血清的反应原性

Fig.4 Analysis of the reactivity of four p30 protein amino acid sequence fragments with serum by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

性抗体<sup>[14]</sup>, p30 抗体对病毒内化有一定的抑制作用<sup>[15]</sup>, 因此较多诊断试剂和亚单位疫苗的研制均将 p30 蛋白列为重要的研究靶标。

通常以单克隆抗体来获取 p30 蛋白抗原信息, 目前已制备出多株 p30 单克隆抗体, 同时对 p30 蛋

与系列稀释的 p30 免疫兔血清均保持较好的免疫反应, 由此可见 P-2# 和 P-3# 诱导的兔多抗效价弱于 P-1# 和 P-4#, 硫氧还蛋白 (Trx) 与 ASFV 阳性猪血清和 p30 免疫兔血清均无反应。

### 3 讨论

非洲猪瘟是一种高传染性动物疫病, 家猪感染后死亡率最高可达 100%, 20 世纪 90 年代末, 其流行仅限于非洲大陆和欧洲部分地区, 2007 年高加索地区出现非洲猪瘟疫情, 加速了其在欧洲和亚洲的流行<sup>[11-12]</sup>, 现今 ASFV 基因 II 毒株已经传至世界各大洲<sup>[13]</sup>。目前, 由于尚未有成熟的非洲猪瘟疫苗, 对于该病的防控依赖于主动监测, ASFV 可编码接近 200 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中结构蛋白 p30 分布于病毒囊膜的内膜, 是 ASFV 主要的免疫原性蛋白之一, p30 和 p54 的嵌合蛋白可产生中和

白的表位有了进一步认识<sup>[16-17]</sup>。本研究通过对 p30 蛋白氨基酸序列进行分段原核表达, 直接分析 ASFV 阳性猪血清和 p30 免疫兔血清与不同 p30 蛋白氨基酸序列片段的反应原性, 结果显示 P-2# 与 p30 免疫兔血清有免疫反应, 但与 ASFV 阳性猪血

清反应较弱,表明 p30 蛋白氨基酸序列中第58~101 位片段的反应原性弱,而该片段内已被证实含有 p30 单克隆抗体识别的抗原表位(61~93 aa)<sup>[18]</sup>。有研究以甲病毒表达的关联片段(61~110 aa)2 次免疫 10 头猪,不能有效激活抗体产生(转阳比例 1/10),以 ASFV 弱毒株 OURT88/3 继续攻毒后,才激活了抗体产生(转阳比例 9/10)<sup>[19]</sup>。综上,该片段存在的抗原表位(61~93 aa)可能不是 p30 的优势抗原表位,其抗体的产生需要该片段抗原的多次刺激。此外,甲病毒表达的 p30 的不同氨基酸片段,发现 p30 (1~100 aa)与 ASFV 弱毒株 OURT88/3 感染血清的反应原性最弱,同时推测 p30 蛋白的优势抗原区域集中在101~150 aa<sup>[19]</sup>,而本研究以大肠杆菌原核表达 p30 蛋白不同氨基酸片段,发现P-1#(8~101 aa)与 ASFV 阳性猪血清的反应原性高于 P-3#(101~158 aa),上述结果差异是否与蛋白质表达系统差异或者血清来源差异有关,值得后续进一步研究。

原核表达系统表达 p30 全长蛋白,用于建立 ASFV 抗体检测方法已见多次报道<sup>[20-21]</sup>,但多数获得的蛋白质是以包涵体形式表达,尽管通过蛋白质复性可恢复部分活性,但复性效率较低。本研究通过大肠杆菌表达系统表达了 p30 蛋白氨基酸序列系列片段,其中 P-1#(8~101 aa)和 P-3#(101~158 aa)均是可溶性表达,同时 P-1#(8~101 aa)能够与 ASFV 阳性猪血清和 p30 免疫兔血清有较好的反应原性,仅次于包涵体表达的 P-4#(8~194 aa),结果表明 P-1#(8~101 aa)可用于后续 ASFV 诊断候选靶抗原。此外,研制非洲猪瘟诊断试剂时,由于制备 ASFV 感染或免疫阳性猪血清有条件限制,常以蛋白质免疫猪或其他种属动物制备阳性血清替代,本研究中 1.0 mg/L 包被的 P-2#与 ASFV 阳性猪血清反应较弱,但与 p30 免疫兔血清有较明显的免疫反应,表示经过抗原的多次免疫刺激可能存在较弱抗原性区域反应性提升的现象,因此建议筛选诊断优势抗原和优化诊断方法时,应慎重选用多次免疫血清去评价。

## 4 结 论

本研究分析了非洲猪瘟病毒 p30 蛋白不同氨基酸序列片段反应原性,发现 p30 蛋白的8~101 aa 氨基酸序列片段可在大肠杆菌表达系统中实现可溶性

表达,同时该氨基酸序列为 p30 潜在抗原优势区域。

## 参考文献:

- [1] BLOME S, GABRIEL C, BEER M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1):122-130.
- [2] SHI Z G, CAO L Y, LUO J C, et al. A chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay for the detection of antibody against African swine fever virus [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11):3779-3788.
- [3] WU K, LIU J, WANG L, 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] SUN E C, ZHANG Z J, WANG Z L, et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020 [J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(5):752-765.
- [5] 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]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1):2183-2193.
- [6] JIA N, OU Y W, PEJSAK Z, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection [J]. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(2):135-143.
- [7] 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.
- [8] GÓMEZ-PUERTAS P, RODRÍGUEZ F, OVIEDO J M, et al. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response [J]. *Virology*, 1998, 243(2):461-471.
- [9] HÜBNER A, PETERSEN B, KEIL G M, et al. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L) [J]. *Scientific Report*, 2018, 8(1):1449.
- [10] ZHOU J M, NI Y X, WANG D D, et al. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay targeting the-p30 protein for detection of antibodies against African swine fever virus [J]. *Viruses*, 2023, 15(1):154.
- [11] DANZETTA M L, MARENZONI M L, IANNETTI S, et al. African swine fever: lessons to learn from past eradication experiences. A systematic review [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7:296.
- [12] JURADO C, FERNÁNDEZ-CARRIÓN E, MUR L, et al. Why is African swine fever still present in Sardinia? [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2):557-566.
- [13] LIBERTI R, COLABELLA C, ANZALONE L, et al. Expression of a recombinant ASFV p30 protein and production of monoclonal an-

- tibodies[J]. *Open Veterinary Journal*, 2023, 13(3):358-364.
- [14] BARDERAS M G, RODRÍGUEZ F, GÓMEZ-PUERTAS P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins[J]. *Archives of Virology*, 2001, 146(9):1681-1691.
- [15] 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.
- [16] ZHOU G J, SHI Z W, LUO J C, et al. Preparation and epitope mapping of monoclonal antibodies against African swine fever virus P30 protein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(3):1199-1210.
- [17] 马天天, 张亚楠, 冯亚文, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(7):2832-2842.
- [18] PETROVAN V, YUAN F F, LI Y H, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus[J]. *Virus Research*, 2019, 269:197632.
- [19] MURGIA M V, MOGLER M, CERTOMA A, et al. Evaluation of an African swine fever (ASF) vaccine strategy incorporating priming with an alphavirus-expressed antigen followed by boosting with attenuated ASF virus[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(2):359-370.
- [20] 张文燕, 陈立功, 腾召剑, 等. 基于非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(7):1320-1326.
- [21] JIN J X, BAI Y L, ZHANG Y Y, et al. Establishment and characterization of a novel indirect ELISA method based on ASFV antigenic epitope-associated recombinant protein[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(Pt7):127311.

(责任编辑:黄克玲)