

非洲猪瘟病毒 pH124R 蛋白的原核表达 及多克隆抗体的制备

戴观丽^{1,2}, 周艳龙², 武正前³, 宋大铭², 蔡祎平², 周玉龙^{1*}, 李丹^{2*}, 郑海学^{2*}
(1. 黑龙江八一农垦大学 动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 中国农业科学院 兰州兽医研究所
兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
3. 古浪县农业产业化服务中心, 甘肃 武威 733000)

摘要: 首先, 通过 PCR 扩增和同源重组技术构建了 pET-28a-H124R 重组原核表达质粒。经 IPTG 诱导, pH124R 蛋白在大肠杆菌中高效表达, 并通过镍柱亲和层析法纯化获得重组蛋白。随后, 用 pH124R 重组蛋白免疫豚鼠, 制备了特异性多克隆抗体。通过 SDS-PAGE、Western-blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 对其进行检测, 结果表明该抗体能够特异性识别 ASFV 感染细胞中表达的内源 pH124R 蛋白, 且该蛋白主要定位于细胞质病毒工厂区域。本研究成功实现了 ASFV pH124R 蛋白的原核表达, 并制备了可用于 Western-blot 和 IFA 试验的特异性多克隆抗体, 为深入研究 pH124R 蛋白的生物学功能提供了重要生物学材料。

关键词: 非洲猪瘟病毒; pH124R 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

Prokaryotic expression of African swine fever virus pH124R and preparation of the polyclonal antibodies

DAI Guanli^{1,2}, ZHOU Yanlong², WU Zhengqian³, SONG Daming², CAI Yiping², ZHOU Yulong^{1*},
LI Dan^{2*}, ZHENG Haixue^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention/College of Veterinary Medicine of Lanzhou University/
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, China;
3. Gulang County Agricultural Industrialization Service Center, Weiwu 733000, China)

Abstract: First, the pET-28a-H124R recombinant prokaryotic expression plasmid was constructed using PCR amplification and homologous recombination techniques. Following IPTG induction, the pH124R protein was efficiently expressed in *E. coli* and purified by Ni-NAT affinity chromatography to obtain the recombinant protein. Subsequently, guinea pigs were immunized with the purified pH124R recombinant protein to prepare specific polyclonal antibodies. Detection by SDS-PAGE, Western-blot, and indirect immunofluorescence assay (IFA) showed that the antibody specifically recognizes the endogenous pH124R protein expressed in ASFV-infected cells, with the protein primarily localized in the cytoplasmic viral factory regions. This study successfully achieved the prokaryotic expression of the ASFV pH124R

收稿日期:2025-01-22; 修回日期:2025-03-04

基金项目: 甘肃省重大人才项目(212068657016); 甘肃省陇原青年英才(20230102); 甘肃省科技重大专项(21ZD3NA001-5, 22ZD6NA001); 国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFD1800100); 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目(LJGXCG2024-F07); 甘肃省青年科技基金项目(25JRRA445)

作者简介: 戴观丽(1999-), 女, 广西梧州人, 硕士生, 专业为预防兽医学, E-mail: gl_dai1990@163.com。*通讯作者: 周玉龙(1980-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: zhouyulong@163.com; 李丹(1982-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事新发病的致病、感染和免疫机制的研究, E-mail: lidan@caas.cn; 郑海学(1979-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物传染病学与流行病学研究, E-mail: zhenghaixue@caas.cn。

protein and prepared specific polyclonal antibodies suitable for Western-blot and IFA experiments. These antibodies provide important biological materials for in-depth studies on the biological functions of the pH124R protein for African swine fever.

Key words: African swine fever virus;pH124R protein;prokaryotic expression;polyclonal antibodies

***Corresponding authors:** ZHOU Yulong,zhouyulong@163.com;LI Dan,lidan@caas.cn;ZHENG Haixue,zhenghaixue@caas.cn

非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)感染引起的一种高度传染性病毒性疾病,具有病程短、发病率和死亡率高的特点。该病被世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health,WOAH)列为法定报告的动物疫病之一。ASF于1909年在肯尼亚首次被诊断出来,并于1921年得到确认,随后在非洲大陆的其他地区陆续暴发。2018年,中国辽宁省沈阳市报告了首例非洲猪瘟病例,随后迅速蔓延至全国23个省份,给国内养猪业造成严重的经济损失^[1]。目前尚无针对ASF安全有效的疫苗和抗病毒药物,其快速传播对我国猪肉产业、动物蛋白供应和饲料行业造成了严重破坏性影响^[2]。

ASFV是非洲猪瘟病毒科、非洲猪瘟病毒属的唯一成员,是目前已知唯一由虫媒传播的大型双链DNA病毒^[3]。家猪、野猪、疣猪、灌木猪和软蜱为ASFV宿主,猪单核-巨噬细胞是主要的靶细胞^[4]。ASFV病毒粒子呈约200nm的正二十面体,由外囊膜、衣壳、内囊膜、核芯壳、类核五部分组成,衣壳由一种主要蛋白(p72)和四种次要蛋白(M1249L、p17、p49和H240R)构成。与大多数DNA病毒不同,ASFV在细胞浆中进行复制,其基因组为末端共价闭合的线性双链DNA,大小为170~193kb。ASFV的基因组可以分为三部分:末端的发卡环结构、紧邻末端的可变区和中间较为稳定的基因编码区。其中,可变区基因拷贝数的变化是导致ASFV基因组大小不等的主要因素。ASFV基因组包含151~167个开放阅读框(open reading frame,ORF),可编码150~200种蛋白质,包括68个结构蛋白和超过100个非结构蛋白,这些蛋白不仅参与病毒组装,还参与DNA复制和修复以及基因表达。此外,ASFV基因组编码多种参与逃避宿主防御的蛋白,包括I型干扰素和细胞死亡途径,但仍有大约一半的ASFV基因缺乏任何已知或可预测的功能^[5]。

非洲猪瘟病毒粒子的组成成分在很大程度上仍然未知。早期研究者通过一维和二维凝胶电泳对高度纯化后的细胞外病毒粒子进行分析,检测到34

至54种多肽,其大小范围在10到150kDa之间^[6]。2018年Alejo A通过质谱分析证实了先前描述的大多数多肽,并发现了44种新型病毒多肽,包括p5、p8、p10(pK78R)、pA104R、pB119L、pC122R、p12(pO61R)、pEP84R、p11.5(pA137R)、p17(pD117L)和pH124R等^[7]。由于ASFV基因组的复杂性以及宿主-病毒相互作用信息的匮乏,加上未识别基因所带来的阻碍,使得ASFV疫苗研发与治疗方案进展受限。亟需深入探究ASFV的感染过程和致病机制,明确基因组结构和功能,为ASFV的防控提供理论依据。因此,对未知蛋白功能进行解析显得尤为重要。本研究利用原核表达系统成功表达了pH124R蛋白,通过低温诱导、纯化和免疫,制备出豚鼠源多克隆抗体,并检测其特异性。为进一步研究非洲猪瘟病毒pH124R蛋白的生物学功能及其致病机制提供关键生物材料。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞和实验动物

ASFV分离株CN/GS/2018来自中国农业科学院兰州兽医研究所非洲猪瘟区域实验室。PAM(猪肺泡巨噬细胞)通过支气管肺泡灌洗法制备^[8],并在含有2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素和100mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,在37℃、50mL/LCO₂且水蒸气饱和的环境中生长。6周龄的豚鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

1.2 载体、菌株及主要试剂

原核表达载体pET-28a、大肠杆菌BL21(DE3)和大肠杆菌DH5α由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学创新团队保存。2xGenRec重组试剂盒购自通用生物(安徽)股份有限公司。PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase购自宝生物工程(大连)有限公司。Trelief[™] Prestained Protein Ladder、DL2 000 DNA Marker和DL5 000 DNA Marker均购自北京擎科生物科技有限公司。Fast-Digest EcoR I、FastDigest HindIII、Alexa Fluor[™] 594

山羊抗小鼠 IgG 和 Alexa Fluor™ 488 山羊抗家兔 IgG 均购自 Thermo Scientific 公司。胶回收试剂盒和 Plasmid Mini Ki 质粒小提试剂盒均购自 Omega 生物公司。Omni-Easy™ PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自雅酶公司。HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自 Sigma 公司。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂均购自 Sigma 公司。转染试剂 JetPRIME 购买自 Polyplus 公司。4% 甲醛固定液购自 Biosharp 公司。His 标签蛋白纯化试剂盒、DAPI 染色液购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 原核表达质粒 pET-28a-H124R 的构建

参考非洲猪瘟病毒 H124R 基因的序列 (GenBank ID: 22220345), 设计 H124R 基因的特异性引物。将 H124R 基因克隆于原核表达质粒中, 构建重组质粒 pET-28a-H124R, 所需引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司 (西安) 合成, 引物序列如表 1 所示。

表 1 ASFV H124R 基因扩增引物序列

Table 1 ASFV H124R gene amplification primer sequences

引物名称 Primer names	序列 (5'→3') Sequences
pET28a-H124R-F	tgggtcgcggatccgaattcatgaatcttgaatacgtcca- agttg
pET28a-H124R-R	ctcgagtgcggccgcaagcttgattaataaaggcttaca- ttttatg

以感染 ASFV 的 PAM 细胞 cDNA 为模板扩增 ASFV H124R 基因。将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 按照胶回收试剂盒说明书对目的条带进行回收。按照 2x GenRec 重组试剂盒说明书, 将目的基因与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切后的 pET-28a 进行连接。经转化、酶切和测序正确后将其命名为 pET-28a-H124R。

1.4 重组蛋白 pET-28a-H124R 的诱导表达

将原核表达质粒 pET-28a-H124R 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落转接到含卡那抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 摇床培养, 当 D_{600} 达到 0.4~0.6 时, 分别加入终浓度为 0.1、0.5、1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 在 16 °C 下诱导过夜。菌液 5 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 使用 200 μ L PBS 缓冲液重悬沉淀进行超声, 超声功率为 30%, 超声共 2 min (超声 5 s, 停止 5 s)。将裂解后的混合物 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 通过 SDS-PAGE 电泳对诱导前后的上清和沉淀进行分析。

1.5 pH124R 重组蛋白的纯化

按照 1.4 的方法诱导 1 L 菌液, 超声破碎后 4 °C、

12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液进行纯化。将上清液进行纯化, 并通过 Western-blot 和 SDS-PAGE 对洗脱的纯化蛋白进行分析。将验证后的蛋白进行浓度测定, 保存于 -20 °C, 便于后期进行动物免疫。

1.6 动物免疫及多克隆抗体的制备

将已纯化的 pH124R 蛋白与弗氏完全佐剂进行等体积乳化, 按照每只 100 μ g 的剂量通过肌肉注射免疫 6 周龄豚鼠。首次免疫后第 14 天对豚鼠进行加强免疫, 加强免疫时使用弗氏不完全佐剂与 pH124R 蛋白等体积乳化, 免疫剂量和免疫途径均与首次免疫相同。免疫结束后第 7 天对豚鼠进行心脏采血, 分离血清后加入 1 mL/L 叠氮钠后置于 -80 °C 保存。

1.7 多克隆抗体特异性检测

1.7.1 Western-blot 鉴定 将 PAM 细胞接种于 6 孔板培养皿, 待细胞贴壁后感染 ASFV, 48 h 后 PBS 洗 3 次, 加入裂解液冰上裂解 3 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min; 取上清加入等体积 2 \times 蛋白上样缓冲液, 100 °C 金属浴加热 10 min。按照雅酶公司 PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书配制 1.5 mm 凝胶, 根据蛋白表达量确定上样量, 并加入 Protein Ladder; 电压设置为 150 V, 待染料到达凝胶底部时即可停止电泳。按照黑面-海绵-滤纸-蛋白胶-硝酸纤维素膜-滤纸-海绵-白面的顺序组装转印夹, 并按照黑对白将转印夹放入转膜槽中, 将电流调至 100 mA, 转膜时间为 60 min。将硝酸纤维素膜取出放入 50 g/L 脱脂奶粉溶液中于室温慢摇床封闭 60 min, 以减少非特异性结合; 封闭后过夜孵育 1:1 000 倍稀释的 pH124R 免疫的豚鼠血清; 使用 TBST 进行洗膜, 每次 5 min, 共 4 次; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:20 000 倍稀释), 室温孵育 1 h; 使用 TBST 进行洗膜, 每次 5 min, 共 4 次; 将 ECL 显色试剂盒 A、B 液等体积混匀, 将膜置于显色液中室温孵育 1 min, 通过高分辨率图像采集系统扫描硝酸纤维素膜并保存结果。

1.7.2 间接免疫荧光试验 (IFA) 使用多聚赖氨酸预处理共聚焦小皿 1 h, PBS 清洗 3 次, 烘干后复苏 PAM 细胞并感染 ASFV (MOI=1), 48 h 后使用 PBS 清洗 1 次, 加入 500 μ L 4% 多聚甲醛室温固定 30 min; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 每孔加入 500 μ L 0.2% Triton X-100, 通透 10 min; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 每孔加入 500 μ L 50 g/L BSA 室温封闭 30 min; 弃去封闭液, 加入 1:200 倍稀释的阴性血清或 pH124R 免疫的豚鼠血清, 4 °C 过夜孵育; PBS 清洗 3 次, 每次

5 min, 每孔加入 1:200 倍稀释的 Alexa Fluor™ 594 山羊抗小鼠 IgG 和 Alexa Fluor™ 488 山羊抗家兔 IgG, 室温孵育 30 min; PBS 清洗 3 次, 加入 500 μL DAPI, 对细胞核染色 10 min, PBS 清洗 2 次后, 使用蔡司 LSM980 共聚焦激光扫描显微镜进行分析。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-28a-H124R 的构建与鉴定

以 ASFV 分离株 CN/GS/2018 为模板, 参考 GenBank ID22220345 设计的 H124R 基因特异性引物 pET28a-H124R-F 和 pET28a-H124R-R 用于扩增 H124R 基因。经过琼脂糖凝胶电泳分析, 获得与预期大小一致的扩增片段 414 bp(图 1)。

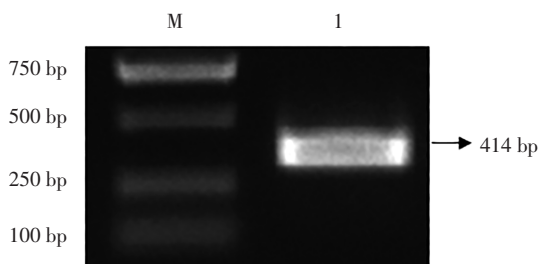


图 1 ASFV H124R 基因的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of the ASFV H124R gene

M: DNA 分子质量标准; 1: H124R 基因扩增产物。

M: DL2 000 DNA Marker; 1: H124R gene amplification product.

利用同源重组方法将 H124R 基因插入经双酶切的 pET-28a 质粒, 并转化到 DH5α 感受态细胞, 经双酶切和测序后成功获得重组质粒 pET-28a-H124R(图 2)。

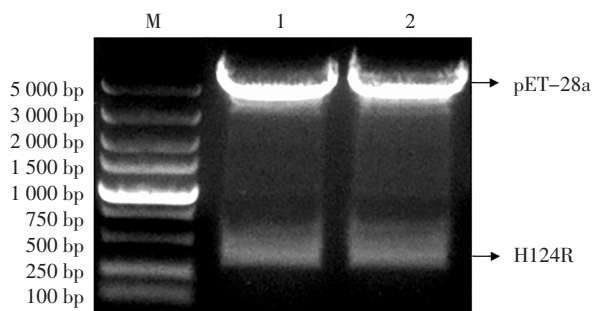


图 2 pET-28a-H124R 的双酶切鉴定

Figure 2 Identification of pET-28a-H124R by double enzyme digestion

M: DNA 分子质量标准; 1, 2: pET-28a-H124R 的 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切产物。

M: DL2 000 DNA Marker; 1, 2: pET-28a-H124R double enzyme digestion of *EcoR* I and *Hind* III.

2.2 重组蛋白 pH124R 的诱导表达

将 pET-28a-H124R 转化至 BL21 感受态细胞, 挑取单克隆菌落在 16 °C 下经不同浓度的 IPTG 诱

导过夜, 通过 SDS-PAGE 分析, 结果显示在 18 kDa 处出现明显条带, 与预期分子量一致。此外, 分别使用 0.1、0.5、1 mmol/L IPTG 诱导后, 经检测 pH124R 原核重组蛋白属于可溶性蛋白, 其蛋白表达量未见显著差异(图 3)。

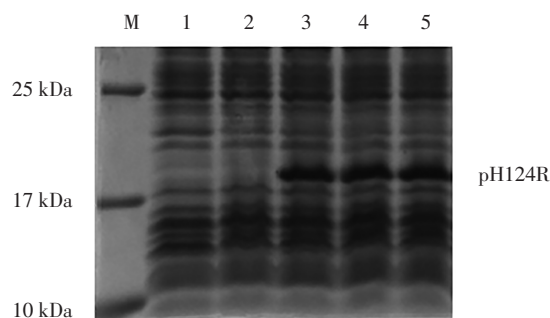


图 3 重组蛋白 pH124R 诱导表达的鉴定

Figure 3 Identification of the recombinant protein pH124R expression under the condition of IPTG induction

M: 蛋白质分子质量标准; 1: BL21 细胞; 2: 未诱导的 pH124R 总蛋白; 3、4、5: 诱导的 pH124R 总蛋白上清(3、4、5 的 IPTG 终浓度为 0.1、0.5、1 mmol/L)。

M: Trelief™ Prestained Protein Ladder; 1: BL21 cells; 2: Uninduced total protein of pH124R; 3, 4, 5: Induced total protein supernatant of pH124R. (IPTG final concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mmol/L for samples 3, 4, and 5).

2.3 pH124R 重组蛋白的纯化

重组蛋白 pH124R 经 His 镍柱亲和层析纯化后, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示在 18 kDa 处出现明显条带, 这与预期大小一致, 结果表明成功获得 pH124R 蛋白(图 4)。

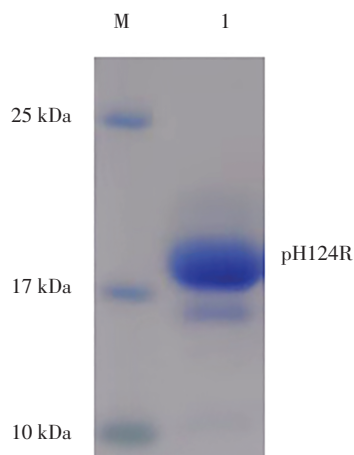


图 4 pH124R 重组蛋白的鉴定

Figure 4 Identification of the pH124R recombinant protein

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化 pH124R 蛋白。

M: P Trelief™ Prestained Protein Ladder; 1: Purified pH124R protein.

2.4 多克隆抗体的特异性检测

2.4.1 Western-blot 鉴定 为了检测 pH124R 多克隆抗体是否能够特异性检测 ASFV 感染细胞后的内源 pH124R 蛋白, PAM 细胞感染 ASFV 后进行 Western-blot 检测。结果显示, 感染组在 13 kDa 处有明显的条带, 与 pH124R 蛋白理论预测大小一致, 对照组未发现相似条带(图 5)。结果表明制备的豚鼠源 ASFV pH124R 蛋白多克隆抗体能够特异性识别结合内源性 pH124R 蛋白。

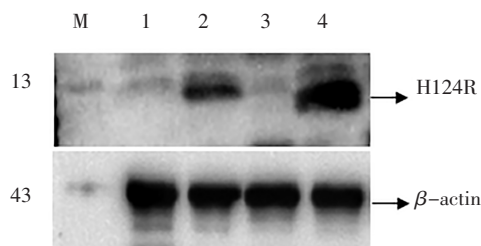


图 5 Western-blot 检测 pH124R 多克隆抗体的特异性

Figure 5 Western-blot detection of the specificity of pH124R polyclonal antibodies

M: 蛋白质分子质量标准; 1, 3: 未感染 ASFV 的 PAM 细胞; 2, 4: 感染 ASFV 的 PAM 细胞(2: 感染 ASFV 24 h, 4: 感染 ASFV 48 h)。

M: P Trelief™ Prestained Protein Ladder; 1, 3: PAM cells not infected with ASFV; 2, 4: PAM cells infected with ASFV (2: infected with ASFV for 24 hours, 4: infected with ASFV for 48 hours).

2.4.2 间接免疫荧光试验 为了进一步验证 pH124R 多克隆抗体是否能够检测 ASFV 感染细胞后 pH124R 的表达, 进行了间接免疫荧光试验。结果显示, pH124R 多克隆抗体在感染 ASFV 的 PAM 细

胞中出现了显著的红色荧光信号并且与病毒工厂中的 p54 蛋白具有共定位现象, 表明 pH124R 蛋白定位于细胞质(包括病毒工厂)和细胞核中(图 6)。

3 讨论

非洲猪瘟是由一种大型双链 DNA 病毒引起的, 主要感染家猪和野猪。该病毒通常表现为高热、食欲减退、抑郁状态、皮肤发红或紫斑、呼吸困难和腹泻等症状, 最终导致被感染猪迅速死亡。ASFV 基因组包含 151~167 个开放阅读框(ORF), 通过特定启动子和时间编程调控生成不同长度的转录本。ASFV 基因组转录不同时期病毒 mRNA, 分别为立即早期基因、早期基因、中期基因和晚期基因^[9]。早期蛋白通过调节其他病毒蛋白的表达或宿主细胞内环境来促进病毒复制, 例如通过调控干扰素反应、细胞增殖或宿主细胞周期。晚期表达的病毒蛋白被认为与病毒组装、病毒粒子形成、释放、毒力以及细胞凋亡有关。目前, 只有少数 ORF 具有调节免疫逃逸、病毒-宿主相互作用和病毒毒力的功能, 许多 ORF 的功能仍未知。为了进一步揭示 ASFV 感染机制和致病机制, 研究学者不断挖掘基因组的组分和 ORF 功能, 2018 年 Alejo A 等发现的多种潜在结构蛋白功能至今尚不完全明了, 亟需进一步研究。

目前抗体制备技术主要包括四大方法: 免疫接种、基因工程、噬菌体筛选和化学合成。单克隆抗体通过 B 细胞克隆产生, 具有高特异性、均一性和易于规模化的优势, 广泛应用于疾病诊断和治疗, 但

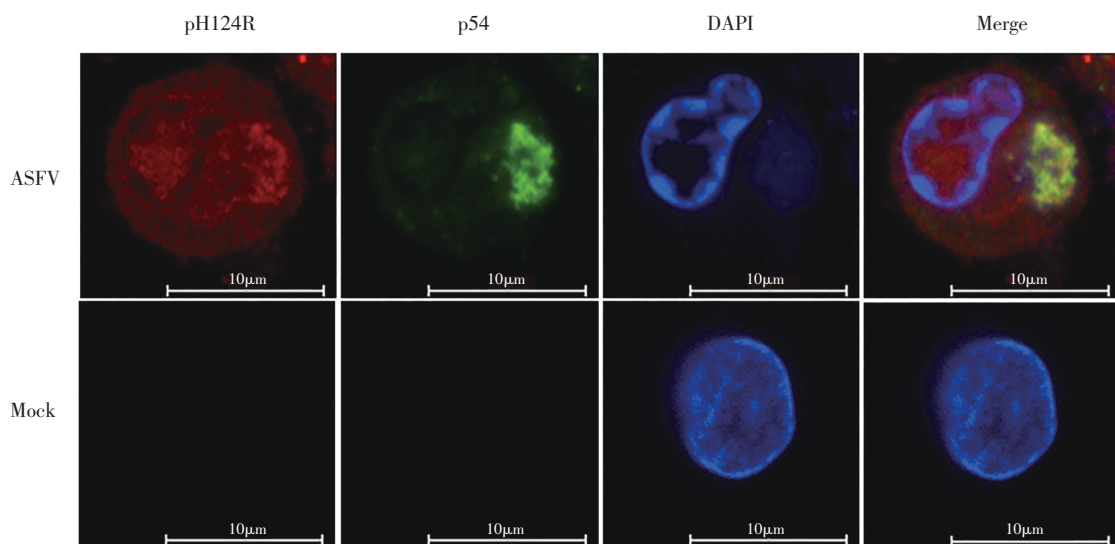


图 6 IFA 检测 pH124R 多克隆抗体

Figure 6 IFA tests pH124R polyclonal antibodies

ASFV: 感染 ASFV 的 PAM 细胞; Mock: 未感染 ASFV 的 PAM 细胞。

ASFV: PAM cells infected with ASFV; Mock: PAM cells not infected with ASFV.

其工艺复杂、成本较高,且仅识别单一抗原表位。多克隆抗体由多 B 细胞群体产生,能识别多个抗原表位,显著提高检测灵敏度,并对抗原变异适应性更强。此外,其生产工艺简单、成本较低,更适用于快速筛查和基础研究。高质量的抗原是制备优质多克隆抗体的关键因素。ASFV pH124R 蛋白具有较少的二级结构,缺乏复杂的翻译后修饰,并为小型蛋白,便于在原核系统正确折叠和表达。因此,原核表达系统适合用于 ASFV pH124R 蛋白的制备。本研究利用大肠杆菌成功表达了 ASFV pH124R 重组蛋白,蛋白质分子量约为 18 kDa。此外,荧光共聚焦显微镜结果显示 pH124R 定位于细胞质(包括病毒工厂)和细胞核中。

病毒工厂(viral factories, VFs)是 ASFV 在宿主细胞质内利用改造的内质网膜结构构建的复制核心区域,其主要功能包括病毒基因组复制、病毒颗粒组装和成熟^[10]。VFs 通过隔离宿主免疫防御机制并集中病毒资源,从而实现 ASFV 的高效增殖。目前,已鉴定出定位于 VFs 的关键蛋白包括结构蛋白、复制酶、调控蛋白和辅助蛋白,这些蛋白进行协同作用,确保 ASFV 完成从复制到释放的生命周期。例如, p72 作为病毒衣壳的主要结构蛋白,直接参与病毒粒子的组装过程,其正确折叠和稳定性依赖于分子伴侣蛋白 pB602L 的辅助^[11]。此外, p54 和调节蛋白 p30 分别通过介导病毒粒子运输和内化过程,调控病毒在宿主细胞内的扩散与感染效率^[12]。在病毒 DNA 复制与修复过程中, pE120R、pI215L、pK205R、pF334L 和 pD117L 等蛋白通过协同作用,确保病毒基因组的高效复制与稳定性。值得注意的是, pA104R 因其组蛋白样特性,可能通过调控病毒基因组包装过程,参与 VFs 的结构形成^[13]。这些蛋白的功能研究揭示了 ASFV 复制的复杂机制: VFs 不仅是病毒组装的物理场所,更是多种生化反应(如 DNA 复制、蛋白修饰)的动态枢纽。若任一关键蛋白的定位或功能受损,将导致病毒复制中断或粒子组装失败。例如,敲除 pB602L 会因 p72 无法正确折叠而抑制衣壳的形成^[14]; 干扰 p54 则阻碍病毒粒子的运输与释放^[15]。本研究的共聚焦显微镜结果显示, pH124R 蛋白定位于 VFs 中,有可能参与 VFs 的形成或者对 ASFV 复制具有重大作用。因此,靶向 pH124R 蛋白可能成为开发抗 ASFV 药物或疫苗的新策略。此外,通过解析 VFs 关键蛋白的相互网络,可为阻断 ASFV 感染提供精准的分子靶点,这对防控非洲猪瘟疫情具有重要的理论和实践意义。

本研究针对 ASFV H124R 基因构建了 pET-28a-

H124R 重组质粒,并通过 His 镍柱亲和层析纯化 pH124R 蛋白。通过免疫豚鼠成功获得了 pH124R 多克隆抗体。Western-blot 和 IFA 检测结果表明,该多克隆抗体能够特异性识别 pH124R 蛋白。这为进一步研究 ASFV pH124R 蛋白的生物学功能、病毒感染机制提供了重要生物材料。

参考文献 (References)

- [1] LU G, PAN J, ZHANG G. African swine fever virus in Asia: Its rapid spread and potential threat to unaffected countries[J]. *J Infect*, 2020, 80: 350-371.
- [2] SHURSON G C, PALOWSKI A, VAN DE LIGT J L G, *et al.* New perspectives for evaluating relative risks of African swine fever virus contamination in global feed ingredient supply chains[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69: 31-56.
- [3] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99: 613-614.
- [4] SALGUERO F J. Comparative pathology and pathogenesis of African swine fever infection in swine[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 282.
- [5] 陈玲玲, 郝雨, 杨金柯, 等. 非洲猪瘟病毒调控宿主免疫应答分子机制的研究进展[J]. *中国兽医科学*. 2023, 53: 9-15.
- [6] CARRASCOSA A L, DEL VAL M, SANTARÉN J F, VIÑUELA E. Purification and properties of African swine fever virus[J]. *J Virol*, 1985, 54: 337-344.
- [7] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, ANDRÉS G. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle [J]. *J Virol*, 2018, 92(23): e01293-18.
- [8] KAPETANOVIC R, FAIRBAIRN L, BERARDI D, *et al.* Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2012, 188: 3382-3394.
- [9] RODRIGUEZ J M, SALAS M L, VIÑUELA E. Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus[J]. *J Virol*, 1996, 70: 8584-8589.
- [10] CARVALHO Z G, DE MATOS A P, RODRIGUES-POUSADA C. Association of African swine fever virus with the cytoskeleton[J]. *Virus Res*, 1988, 11: 175-192.
- [11] GARCÍA-ESCUDERO R, ANDRÉS G, ALMAZÁN F, VIÑUELA E. Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72[J]. *J Virol*, 1998, 72: 3185-3195.
- [12] RODRIGUEZ J M, GARCÍA-ESCUDERO R, SALAS M L, *et al.* African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites[J]. *J Virol*, 2004, 78:

- 4299-1313.
- [13] FROUCO G, FREITAS F B, COELHO J, *et al.* DNA-binding properties of African swine fever virus pN104R, a histone-like protein involved in viral replication and transcription[J]. *J Virol*, 2017, 91(12): e02498-16.
- [14] EPIFANO C, KRIJNSE-LOCKER J, SALAS M L, *et al.* The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle[J]. *J Virol*, 2006, 80:12260-12270.
- [15] RODRIGUEZ F, LEY V, GOMEZ-PUERTAS P, *et al.* The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability[J]. *Virus Res*, 1996, 40:161-167.

(责任编辑 张文举)