

张莹莹, 乐婷, 郎晨, 等. 非洲猪瘟病毒 p49 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (8): 113-119.

ZHANG Y Y, LE T, LANG C, et al. Establishment of an indirect ELISA antibody detection method based on African swine fever virus p49 protein [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (8): 113-119.

非洲猪瘟病毒 p49 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

张莹莹, 乐婷, 郎晨, 张一鹭, 龚文钦, 白娟, 姜平, 高雁妮*

(南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在建立可以检测非洲猪瘟病毒 (ASFV) 结构蛋白 p49 抗体的血清学检测方法。通过构建 pCold I-p49 重组质粒, 以纯化的 p49 蛋白为包被抗原, 优化各项反应条件, 建立间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法, 验证方法的特异性、灵敏性、重复性, 并对临床血清样品进行检测。结果: 获得的重组 p49 蛋白可以与 His 标签抗体和 ASFV 标准阳性血清发生反应, ELISA 方法的抗原包被浓度为 0.8 $\mu\text{g/mL}$, 封闭液为 5% 脱脂乳, 待检血清以 1:400 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h; 二抗工作浓度为 1:20 000, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 四甲基联苯胺 (TMB) 显色 15 min; 该方法的阳性临界值为 0.189 (≥ 0.189 为阳性, < 0.189 为阴性), 且具有良好的特异性、灵敏性、可重复性, 最低检测稀释度为 1:3 200, 批内变异系数在 1.53%~5.91% 之间, 批间变异系数在 3.46%~5.73% 之间, 与商品化试剂盒符合率为 92.39% (85/92)。本研究成功建立 ASFV p49 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法, 为非洲猪瘟诊断方法开发提供重要支持。

关键词: 非洲猪瘟病毒; p49 蛋白; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)08-0113-07

Establishment of an indirect ELISA antibody detection method based on African swine fever virus p49 protein

ZHANG Yingying, LE Ting, LANG Chen, ZHANG Yilu, GONG Wenqin, BAI Juan, JIANG Ping, Gao Yanni*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to establish a serological detection method for antibodies against the structural protein p49 of African swine fever virus (ASFV). A pCold I-p49 recombinant plasmid was constructed, and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was developed using purified p49 protein as the coating antigen. The reaction conditions were optimized, and the specificity, sensitivity, and repeatability of the method were validated, followed by testing of clinical serum samples. The results showed that the obtained recombinant p49 protein reacted with both anti-His tag antibody and ASFV standard positive serum. The optimized ELISA conditions were as follows: the antigen coating concentration was 0.8 $\mu\text{g/mL}$, the blocking solution was 5% skim milk, serum samples were diluted at 1:400 and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 0.5 h, the working concentration of the secondary antibody was 1:20 000, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, and tetramethylbenzidine (TMB) was used for color development for 15 min. The cut-off value of this method was 0.189 (≥ 0.189 considered positive, and < 0.189 considered negative). The method exhibited good specificity, sensitivity, and repeatability, with a minimum detection dilution of 1:3 200. The intra-assay coefficient of variation ranged from 1.53% to 5.91%, and the inter-assay coefficient of variation ranged from 3.46% to 5.73%. The agreement rate with a commercial kit was 92.39% (85/92). An indirect ELISA for detecting antibodies against ASFV p49 protein was successfully established here, providing important support for development of diagnostic methods for African swine fever.

Keywords: African swine fever virus; p49 protein; prokaryotic expression; indirect ELISA

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是一种由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感

染猪引起的急性、烈性、传染性疾病^[1], 其致病力极强, 强毒株感染后的致死率接近 100%, 对养猪业构成毁灭性威胁。1912 年 ASF 首次在肯尼亚暴发^[2], 逐渐突破地域限制向全球扩散, 目前已在欧洲、亚洲、非洲多个国家形成流行态势, 成为影响全球猪肉产业链安全与粮食安全的重大跨境动物疫病。2018 年 8 月我国辽宁省首次发现 ASF 病例^[3], 疫情曾快速蔓延, 给养猪业造成巨额经济损失。鉴于 ASF 的

收稿日期: 2025-09-25; 修回日期: 2026-06-05

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2024M761449); 国家生猪产业技术体系专项 (CARS-35)

第一作者: 张莹莹, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 高雁妮, 副教授, 主要从事动物传染病与免疫学研究, E-mail: yngao@njau.edu.cn。

高危害性与传播复杂性,世界动物卫生组织(WOAH)规定其为法定呈报的动物疫病,我国也将其纳入一类动物传染病进行严格管控。目前,针对ASFV尚无公认安全有效的商品化疫苗,ASFV防控主要依赖于对疾病的早期诊断和对患病动物的及时清除^[4-5]。在此背景下,建立高灵敏、高特异、易操作的ASFV检测方法,对于阻断疫情传播、保障生猪产业稳定发展具有重要意义。

ASFV属于非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属,是现知唯一的虫媒DNA病毒。ASFV为双股线状DNA病毒,具有二十面体形态和独特的5层结构^[6]。ASFV基因组大小约为170~190 kb,包括中央保守区、两侧的可变区以及末端的反向重复序列,可编码150多个开放阅读框。以ASFV的B646L基因作为划分依据,ASFV可被划分为24个基因型,不同基因型ASFV的毒力存在差异^[7]。

p49是由ASFV B438L基因编码的蛋白质,分子量大小为49.3 kDa。它属于ASFV感染晚期表达的一种重要衣壳蛋白,定位于“病毒工厂”^[8]。p49蛋白与pM1249L、pE120、pH240R、p72等衣壳蛋白共同组成ASFV的衣壳结构^[9]。因此ASFV缺少p49蛋白,病毒粒子无法形成完整的衣壳结构,p49在构建或稳定病毒颗粒的二十面体顶点起着一定作用。本研究通过大肠杆菌表达系统成功表达重组p49蛋白,其与ASFV阳性血清反应性良好,提示p49蛋白可以作为ASFV的血清学诊断靶标。鉴于此,本研究以纯化的pCold I-p49重组蛋白作为包被抗原,建立检测ASFV抗体的间接ELISA方法,以期为ASFV血清学检测方法的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和血清

大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自北京索莱宝科技有限公司,大肠杆菌Rosetta感受态细胞由本实验室保存。pCAGGS-p49质粒、pCold I质粒由本实验室保存。猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、伪狂犬病病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪捷申病毒(PTV)阳性血清和猪临床血清均由本实验室收集和保存,ASFV标准阳性血清、标准阴性血清购自普道(北京)标准技术有限公司。

1.2 主要试剂

BamH I、EcoR I限制性内切酶和T4 DNA连接酶均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪IgG抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;ASF ELISA抗体检测试

剂盒购自北京金诺百泰生物技术有限公司;可溶性单组分四甲基联苯胺(TMB)底物溶液购自天根生化科技有限公司;裂解缓冲液(Lysis Buffer,含8 mol/L尿素、100 mmol/L NaH₂PO₄、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L咪唑),洗涤缓冲液(Wash Buffer,含8 mol/L尿素、100 mmol/L NaH₂PO₄、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L咪唑),洗脱缓冲液(Elution Buffer,含8 mol/L尿素、100 mmol/L NaH₂PO₄、300 mmol/L NaCl、100 mmol/L咪唑)以及H₂SO₄终止液由本实验室配制。

1.3 pCold I-p49原核表达载体的构建

根据ASFV的p49基因序列(ASFV/HLJ/2018毒株,GenBank登录号:MK333180.1),应用Premier 5.0软件设计1对扩增引物并在引物两端加入酶切位点。上游引物序列为5'-GGCGGATCCATG-TATCATGATTATGCT-3'(下划线处为BamH I酶切点),下游引物序列为5'-TCCGAATTCCAATGATG-GAGATATAGATG-3'(下划线处为EcoR I酶切位点)。以本实验室保存的质粒pCAGGS-p49为聚合酶链式反应(PCR)模板进行扩增,取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,将与预期相符的DNA片段所在凝胶切下,进行胶回收。使用BamH I和EcoR I分别对回收产物以及pCold I质粒进行双酶切,并将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,将与预期相符的DNA片段所在凝胶切下,进行胶回收。将酶切后的目的片段与载体进行连接并转化,挑取单菌落进行PCR鉴定,将正确菌液扩大培养并提取质粒,使用BamH I和EcoR I对pCold I-p49质粒进行双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.4 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

将pCold I-p49和pCold I质粒转化至新鲜制备的Rosetta感受态细胞中,挑取单菌落于含有氨苄青霉素的LB培养液,置于37℃、180 r/min条件下培养过夜。次日,按照1:100扩培菌液,置于37℃、180 r/min条件下培养至OD_{600 nm}=0.4~0.6。使用终浓度为1 mmol/L的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)对pCold I-p49菌液和pCold I菌液进行大量诱导,置于16℃、180 r/min条件下培养12 h。8 000 r/min离心收集菌体后超声裂解,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

p49重组阳性菌进行大量表达后,使用Lysis Buffer溶解超声裂解后的沉淀,对溶解后样品进行离心,使用Ni柱对溶解后的上清液进行纯化,使用Wash Buffer洗脱2次,使用Elution Buffer洗脱蛋白,收集流穿液和洗脱液并进行SDS-PAGE检测。分别

使用 His 抗体和 ASFV 标准阳性血清对纯化后的蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.5 ASFV 抗体间接 ELISA 方法的建立

使用棋盘法测定不同包被浓度和不同血清稀释度对应的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值。抗原包被浓度设为 2、1、0.8、0.4、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5 个梯度，血清稀释度设为 1:100、1:200、1:400、1:800 这 4 个梯度，分别加入标准阳性血清和标准阴性血清作为对照，计算阳性/阴性 (P/N) 值，确定最佳包被浓度和血清稀释度。在以上最佳条件下，通过控制变量法，计算 P/N 值来确定最佳封闭液、血清最佳作用时间、酶标二抗最佳稀释度、二抗最佳作用时间及 TMB 显色最佳时间。封闭液使用 5% 脱脂乳、2% 明胶、2% 牛血清白蛋白 (BSA)、1% BSA、0.1% BSA，血清孵育时间设置为 30、45、60、90 min，酶标二抗稀释度设置为 1:10 000、1:20 000、1:40 000、1:80 000，二抗孵育时间设置为 30、45、60、90 min，TMB 显色时间设置为 5、10、15、20 min。

1.6 临界值的确定

使用优化后的方法检测 86 份 ASFV 猪阴性血清样品，读取 $OD_{450\text{ nm}}$ 值并计算其平均值 ($\bar{X}$) 和标准差 (SD)。将本次试验得到的 $\bar{X}+3SD$ 设定为此方法的临界值。

1.7 敏感性试验

使用本方法测定倍比稀释的标准阳性血清，稀释度为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400，读取 $OD_{450\text{ nm}}$ 值，分析此方法的分析敏感性。

1.8 特异性试验

为了确定本方法是否具有特异性，选用 5 种常见猪源病毒的阳性血清进行检测，包括 PRRSV、PCV2、PRV、CSFV、PTV，并以 ASFV 标准阳性血清、标准阴性血清作为对照，分析此方法的特异性。

1.9 重复性试验

使用本方法对 3 份标准阳性血清和 2 份标准阴性血清进行检测，通过使用同一批次表达的 p49 重组蛋白，设置 3 个平行重复孔进行批内重复性试验；使用 3 个不同批次表达的蛋白进行批间重复性试验，读取 $OD_{450\text{ nm}}$ 值并计算平均值 ($\bar{X}$) 和标准差 (SD)，根据 $\bar{X}/SD$ 计算变异系数 (CV)，分析此方法的批内重复性和批间重复性。

1.10 符合率试验

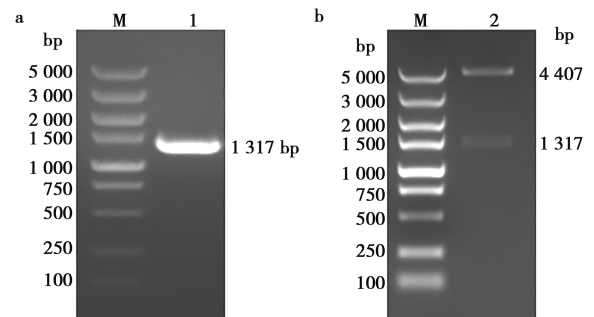
使用本方法与商品化试剂盒同时检测 92 份猪临床血清，本试验方法根据 $OD_{450\text{ nm}}$ 值判定，商品化试

剂盒根据 S/P 值判定，对比两者结果并计算符合率。

2 结果与分析

2.1 pCold I -p49 重组质粒的构建与鉴定

以 pCAGGS-p49 质粒为模板进行 PCR，获得约 1 317 bp 的 p49 片段 (图 1a)。将目的片段与 pCold I 载体连接，重组质粒经双酶切鉴定出现 2 个条带，其中一条为 1 317 bp，与目的片段大小相同，另一条带大小与载体大小相同 (图 1b)。测序结果显示无误。



M. Marker DL5000; 1. p49 基因 PCR 扩增产物; 2. pCold I -p49 双酶切产物。

图 1 pCold I -p49 重组质粒的构建 (a) 与鉴定 (b)

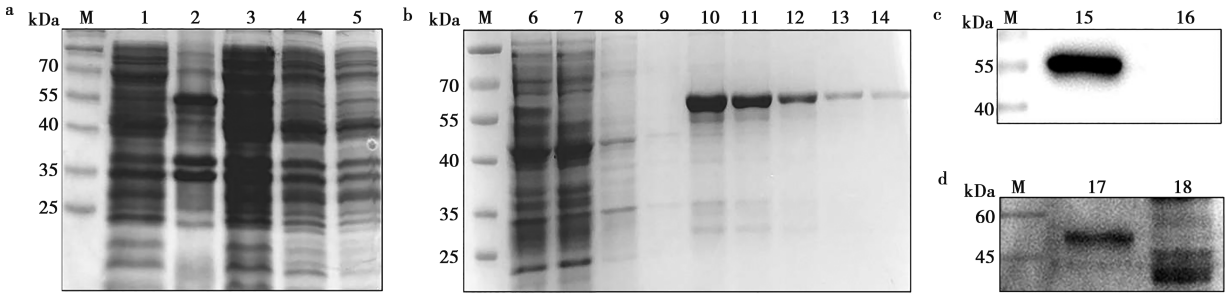
2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

将重组质粒 pCold I -p49 及空载 pCold I 转化至 Rosetta 感受态细胞中，pCold I -p49 和 pCold I 加入 1 mmol/L IPTG 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导 12 h。对菌体进行超声裂解后进行蛋白电泳，结果显示，目的蛋白主要以包涵体形式表达，大小为 55 kDa 左右，与预期蛋白大小相符 (图 2a)。

使用镍柱对包涵体蛋白进行纯化，如图 2b 所示，蛋白纯化效果较好。Western blot 鉴定结果显示，该重组蛋白可分别与 His 标签抗体 (图 2c) 及 ASF 标准阳性血清抗体 (图 2d) 发生特异性结合。这一结果提示，p49 重组蛋白的表达情况符合预期，且其具备较好的反应原性，可满足后续检测方法建立的基础条件。

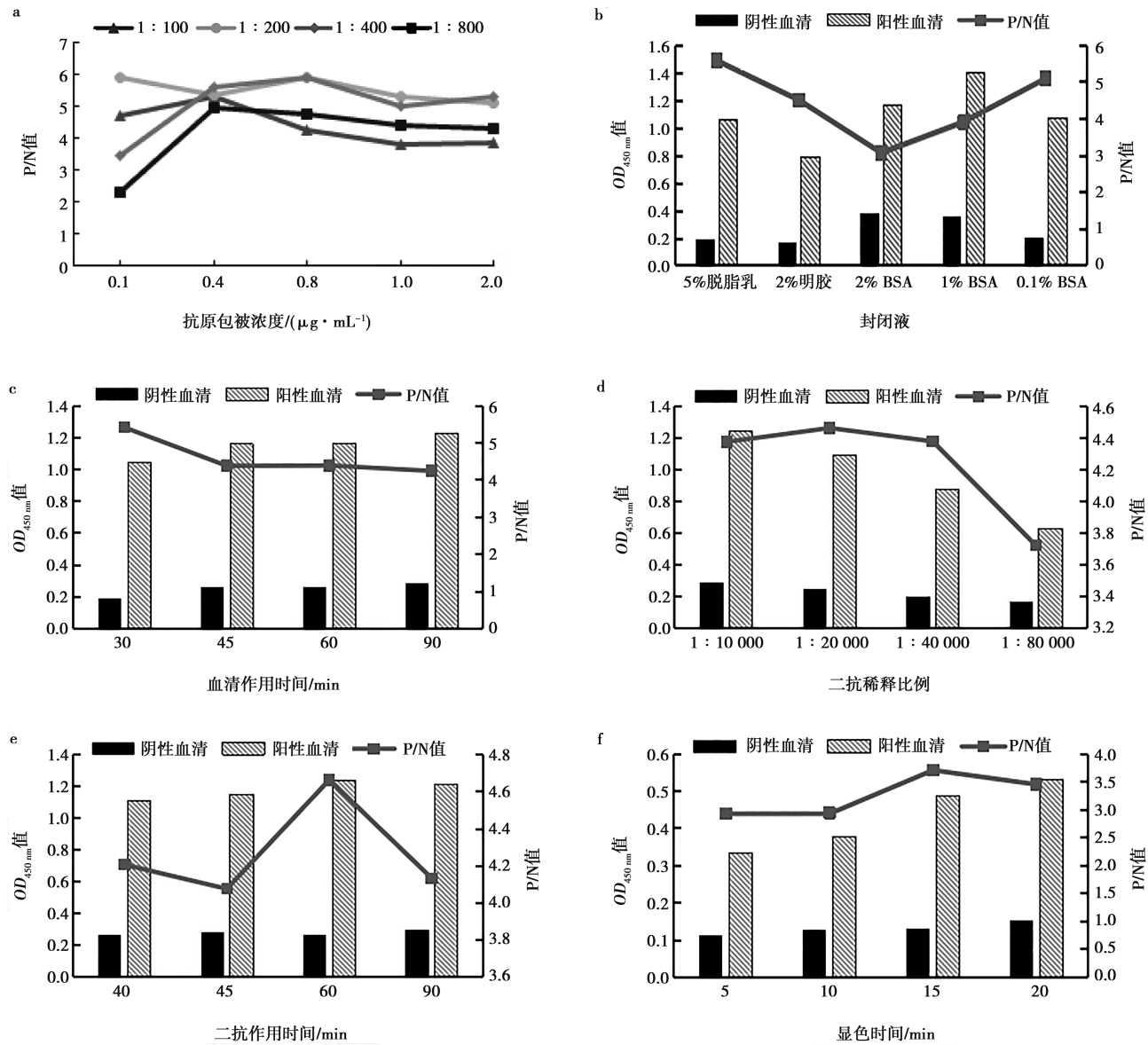
2.3 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法反应条件优化

进行 ASFV p49 间接 ELISA 方法条件优化后，得出抗原包被的最佳浓度为 0.8 $\mu\text{g/mL}$ ，血清稀释的最佳比例为 1:400 (图 3a)；最佳封闭剂为 5% 脱脂乳 (图 3b)；血清最佳作用时间为 30 min (图 3c)；二抗最佳稀释比例为 1:20 000 (图 3d)；二抗最佳作用时间为 60 min (图 3e)；TMB 最佳作用时间为 15 min (图 3f)。



M. 标准蛋白 Marker; 1. 诱导破碎后上清液; 2. 诱导破碎后沉淀; 3. 诱导后全菌; 4. 未诱导全菌; 5、16、18. 空载 pCold I; 6. 纯化前样品; 7. 流穿液; 8~14. 洗脱液; 15、17. 重组蛋白 pCold I -p49。

图2 p49 重组蛋白的表达 (a)、纯化 (b)、His 标签抗体鉴定 (c) 与 ASFV 标准阳性血清学鉴定 (d)



a. 最佳抗原浓度和血清稀释度的确定; b. 最佳封闭液的确定; c. 最佳血清作用时间的确定; d. 最佳二抗工作浓度的确定; e. 最佳二抗工作时间的确定; f. 显色时间的确定。

图3 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法反应条件优化

2.4 临界值的确定

使用以上筛选的最佳作用条件，对 86 份猪阴性血清进行检测（图 4）。阴性样品血清的平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 0.129 8，标准差为 0.019 7。确定阴阳临界值为 0.189，即建立的间接 ELISA 判断条件为：若检测血清样品的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 ≥ 0.189 ，判定为阳性；若检测血清样品中， $0.169 < OD_{450\text{ nm}} < 0.189$ ，判定为可疑；若 $OD_{450\text{ nm}} \leq 0.169$ 时，判定为阴性。

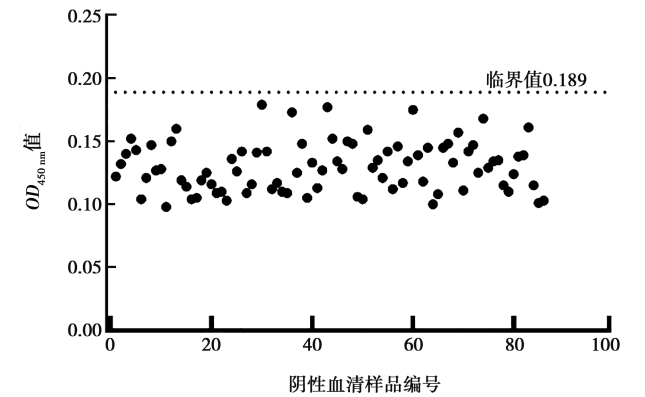


图 4 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法临界值的确定

2.5 特异性试验

使用本方法对 5 种常见猪源病毒阳性血清以及 ASFV 标准阳性血清、标准阴性血清进行检测。血清结果显示，PRRSV、PCV2、PRV、CSFV、PTV 阳性血清、ASFV 标准阴性血清为阴性，ASFV 标准阳性血清为阳性，提示此检测方法特异性良好（图 5）。

2.6 敏感性试验

使用本方法检测 3 份 ASFV 标准阳性血清。当血清稀释比为 1 : 3 200 时，3 份阳性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值均大于临界值 0.189，而当血清稀释比为 1 : 6 400 时 3 份阳性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值均小于临界值 0.189，提示此检测方法具备良好的敏感性（图 6）。

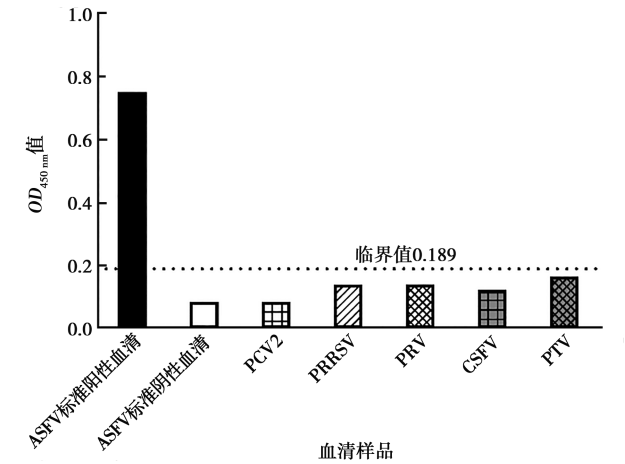


图 5 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法特异性试验

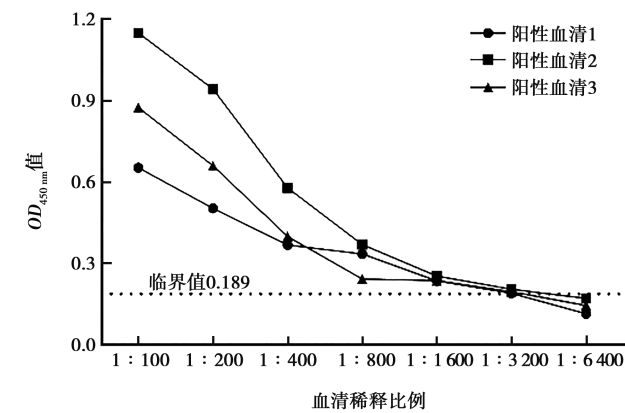


图 6 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法分析敏感性试验

2.7 重复性试验

为判定本方法是否具有重复性，本研究同时检测 3 份阳性血清与 2 份阴性血清，进行重复性试验。结果显示此方法批内变异系数在 1.53% ~ 5.91% 范围内，批间变异系数在 3.46% ~ 5.73% 范围内（表 1），提示此检测方法具有良好的重复性。

表 1 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法批内和批间重复性试验结果

血清	批内重复			批间重复		
	平均数	标准差	CV/%	平均数	标准差	CV/%
阳性	0.766	0.017	2.26	0.765	0.044	5.73
	0.935	0.023	2.47	0.915	0.036	3.98
	0.443	0.026	5.91	0.435	0.015	3.46
阴性	0.136	0.002	1.53	0.124	0.007	5.47
	0.127	0.003	2.27	0.139	0.005	3.60

2.8 符合率试验

使用本研究建立的 p49 间接 ELISA 检测方法与商品化试剂盒共同检测 92 份猪临床血清样品。对比

两者结果显示，此方法阳性符合率为 100%（39/39），阴性符合率为 86.79%（46/53），总符合率为 92.39%（85/92）（表 2）。

表 2 p49 蛋白抗体间接 ELISA 方法符合性检测结果 份

间接 ELISA	商品化试剂盒		总计
	阳性样品	阴性样品	
阳性样品	39	7	46
阴性样品	0	46	46
总计	39	53	92

3 讨论

ASF 是一种能够感染家猪和野猪的高度传染性动物疾病，发病急、致死率极高，且 ASFV 对外界环境的抵抗能力极强，室温条件下在血液、尿液和粪便中可以存活 1 年以上^[10-11]。自首次暴发以来，该疫情已在全球多个国家和地区扩散，对生猪养殖业及相关产业链造成严重冲击。ASFV 的不同基因型之间的毒力存在差异^[9]，其中，急性型 ASF 主要是由 ASFV II 型流行株引起^[12-13]，目前基因 II 型毒株出现显著变异，且遗传多样性增加，并衍生出低毒力变异株。这类变异毒株可在猪群中造成隐性感染，表现为低水平病毒血症和间歇性排毒等非典型临床症状，极大增加了早期识别与防控的难度。此外，部分区域还检测到基因 I 型毒株的流行，使得疫情形势更加复杂，对监测与检测工作提出了更高要求^[14]。荧光定量 PCR、数字 PCR 等核酸检测方法通过检测病毒核酸，具有高灵敏度和特异性，能够较早发现动物感染，是实验室确诊 ASFV 感染的关键技术。然而由于 ASFV 核酸检测对实验室条件要求较高，仅少数政府授权机构单位可进行，无法满足大规模检测需求。血清学方法可通过检测血清中的特异性抗体判断动物是否发生过感染，并检测其免疫水平，操作简便、快捷，适用于临床对疾病感染情况进行大规模筛查。实验室诊断 ASFV 的血清学方法有 ELISA 检测方法、胶体金免疫层析试纸条、间接免疫荧光试验、病毒中和试验等^[15-16]，其中 ELISA 因性能稳定、实用性强，被世界动物卫生组织指定为 ASFV 首选血清学诊断方法^[17]。因此，建立准确度高、特异性强的 ASFV ELISA 检测方法，对完善临床防控技术体系、提升综合防控能力具有重要意义。目前，针对 ASFV 的 ELISA 检测试剂盒主要使用的包被蛋白包括 p72、p54、p30 等。p72 为病毒晚期表达蛋白，感染早期血清中抗体水平可能低于检测阈值^[18]；p54 蛋白作为检测靶标存在特异性和灵敏度相对较低的缺点^[19-20]，部分毒株的 p54 蛋白表位变异可能导致漏检^[21]；p30 作为早期蛋白是早期抗体检测的理想靶标，但现有 ASFV ELISA 检测试剂盒的敏感性和特异性仍有待提高^[22]。因此，筛选新的 ASFV 检测靶标并开发检测

试剂盒至关重要。

在 ASFV 感染宿主细胞的过程中，p49 蛋白可与细胞膜相互作用，表现为完整的膜蛋白，同时 p49 蛋白与 p72 等蛋白共同组成 ASFV 的衣壳结构^[9]。p49 蛋白本身具有多种抗原表位，多种抗原表位能与 ASFV 的阳性血清发生反应，且有研究表明其抗原表位与其他结构蛋白的表位组合使用时，可通过多表位协同作用显著提高检测敏感性^[23]。此外，p49 蛋白的关键表位在不同 ASFV 毒株中高度保守，使其适用于不同基因型毒株的检测，降低因病毒变异导致的漏检率^[24]。

本研究利用原核表达系统表达重组 p49 蛋白，并证实其与 ASFV 标准阳性血清及临床阳性血清均具有良好反应性，提示 p49 蛋白在 ASFV 检测方法上也具有一定潜力。因此，本研究选用 p49 蛋白作为包被抗原，建立了一种高灵敏度、高特异性的间接 ELISA 方法。以 OD_{450 nm} 值作为判定标准，在临床检测中具有快速、便捷的优点。通过使用 3 种标准阳性血清进行检测，测得此方法的血清检测灵敏度为 1 : 3 200，敏感性在文献报道的针对 ASFV 其他蛋白的抗体检测方法中属于较高水平^[25-28]。与常见猪病的阳性血清无交叉反应，特异性良好，与商品化试剂盒总符合率达 92.39%。在后续研究中，可通过扩大血清样本量开展验证试验，或采用间接免疫荧光试验、免疫印迹试验等技术验证血清样本，从而更精准地评估该方法的符合率。此外，后续研究还可采用多抗原或多表位协同表达并组合应用的策略，以提升检测敏感性，进而为开发适用范围更广的 ELISA 试剂盒提供支持。

综上所述，本研究成功建立的 ASFV p49 间接 ELISA 检测方法具备良好的敏感性、特异性与重复性。该方法不仅为 ASF 抗体快速检测试剂盒的研发奠定基础，也为 ASF 的临床诊断及流行病学调查提供技术支持。

参考文献：

[1] MORELLE K, JEZEK M, LICOPPE A, et al. Deathbed choice by ASF-infected wild boar can help find carcasses [J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66 (5): 1821-1826.

[2] 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.

[3] GAO L, SUN X, YANG H, et al. Epidemic situation and control measures of African Swine Fever Outbreaks in China 2018-2020 [J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68 (5): 2676-2686.

[4] 周仁江, 杨治聪, 黄先奇, 等. 非洲猪瘟国内流行现状及诊断、防控 [J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40 (12): 96-99.

[5] PAN L, LUO R, WANG T, et al. Efficient inactivation of African

- swine fever virus by a highly complexed iodine [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 263: 109245.
- [6] SALAS M L, ANDRÉS G. African swine fever virus morphogenesis [J]. *Virus Res*, 2013, 173 (1): 29–41.
- [7] SUN W, LI Y, CHEN L, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (21): 8653–8658.
- [8] 王晓丽, 孙蕾, 刘文军, 等. 非洲猪瘟病毒编码蛋白功能研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46 (7): 1827–1836.
- [9] WANG N, ZHAO D, WANG J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly [J]. *Science*, 2019, 366 (6465): 640–644.
- [10] 殷婕. 非洲猪瘟病毒的活性与灭活 [J]. *兽医导刊*, 2019 (11): 13–14.
- [11] 刘杉杉, 孙伟, 杨慧. 非洲猪瘟的研究进展 [J]. *中国动物保健*, 2019, 21 (12): 21–23.
- [12] SAUTER-LOUIS C, CONRATHS F J, PROBST C, et al. African swine fever in wild boar in Europe: a review [J]. *Viruses*, 2021, 13 (9): 1717.
- [13] CWYNAR P, STOJKOV J, WLAZLAK K. African swine fever status in Europe [J]. *Viruses*, 2019, 11 (4): 310.
- [14] ZHAO D, LIU R, ZHANG X, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8 (1): 438–447.
- [15] 奚嫒牡, 耿鑫梅, 黄香梅, 等. 非洲猪瘟 MGF360–11L 蛋白的原核表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52 (12): 1496–1502.
- [16] 谢禄松. 非洲猪瘟的危害与防控措施 [J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18 (5): 55–57.
- [17] 庄金秋, 梅建国, 谢金文, 等. 非洲猪瘟病毒实验室检测方法研究进展 [J]. *畜牧产业*, 2017, 22: 32–36.
- [18] LIAO HC, SHI Z W, ZHOU G J, et al. Epitope mapping and establishment of a blocking ELISA for MAbs targeting the p72 protein of African swine fever virus [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108 (1): 350.
- [19] 河南农业大学. 源自 ASFV 编码 p72、p54 和 p30 蛋白的表位肽组合、重组蛋白及其应用: CN202310079489.5 [P]. 2024–08–09.
- [20] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 (中国动物卫生与流行病学中心哈尔滨分中心). 一种非洲猪瘟病毒 p54 重组蛋白的间接 ELISA 抗体检测试剂盒及其制备方法: CN202010270120.9 [P]. 2020–04–08.
- [21] HUANG C, CAO C, XU Z, et al. A blocking ELISA based on virus-like nanoparticles chimerized with an antigenic epitope of ASFV P54 for detecting ASFV antibodies [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 19928.
- [22] CAO Y, HAN D, ZHANG Y, et al. Identification of one novel epitope targeting p54 protein of African swine fever virus using monoclonal antibody and development of a capable ELISA [J]. *Res Vet Sci*, 2021, 141: 19–25.
- [23] AFAYIBO D J A, ZHANG Z, SUN H, et al. Establishment of an ELISA based on a recombinant antigenic protein containing multiple prominent epitopes for detection of African swine fever virus antibodies [J]. *Microorganisms*, 2024, 12 (5): 943.
- [24] YANG S, MIAO C, LIU W, et al. Structure and function of African swine fever virus proteins: current understanding [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1043129.
- [25] 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.
- [26] 张锦, 陈艳, 邹剑文, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (3): 83–90.
- [27] 张皓淳. 非洲猪瘟病毒结构蛋白 p54 的优化表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *国外畜牧学 (猪与禽)*, 2022, 42 (2): 35–42.
- [28] 卢婷. 非洲猪瘟病毒 p54 和 pI215L 蛋白原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021.