

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.05.13

非洲马瘟病毒 VP7 蛋白研究进展

张桂铭,张兵,张敏,宋亚芬,王磊,杨承槐*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 05-0087-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 非洲马瘟(African horse sickness, AHS)是由非洲马瘟病毒(African horse sickness virus, AHSV)引起的一种通过库蚊等昆虫传播的、主要感染马科动物的传染病。我国是世界动物卫生组织认可的非洲马瘟无疫国,随着 AHS 疫情在东南亚的传播,增大了疫情传入我国的风险。AHSV 编码了 7 种结构蛋白(VP1~VP7),其中 VP7 是病毒内衣壳蛋白的主要组成部分,在 AHSV 9 个血清型中高度保守,常作检测的靶标。此外,VP7 蛋白的自组装特点对于 AHSV 亚单位疫苗和病毒样颗粒疫苗(VLP)的研究有基础性作用。对当前 AHSV VP7 蛋白相关研究进展进行了综述,以期为 AHSV 检测方法及疫苗等研究提供参考。

[关键词] AHSV;VP7;结构;诊断;疫苗

Research Progress on VP7 Protein of African Horse Sickness Virus

ZHANG Gui-ming, ZHANG Bing, ZHANG Min, SONG Ya-fen, WANG Lei, YANG Cheng-huai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YANG Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

Abstract: African horse sickness (AHS) is an infectious disease caused by African horse sickness virus (AHSV), which mainly infects equines and is transmitted by insects such as *Culicoides*. Our country is an African horse sickness-free country recognized by the World Organization for Animal Health (WOAH). With the spread of the African horse sickness in Southeast Asia, the risk of the epidemic spreading to our country has increased. AHSV encodes 7 structural proteins (VP1~VP7), among which VP7 is the main component of the inner capsid protein, which is highly conserved in the 9 serotypes of AHSV and is often used as a target for detection. In addition, the self-assembly of VP7 protein has a fundamental role in the research of AHSV subunit vaccine and virus-like particle (VLP) vaccine. This article reviews the current progress of AHSV VP7 protein research in order to provide references for AHSV detection methods and vaccine research.

Key words: AHSV; VP7; structure; diagnose; vaccine

基金项目:“十四五”国家重点研发计划“重大外来动物疫病阻断与防控技术研发项目”(2022YFD1800500);兽药行业公益性重点专项“非洲马瘟病毒毒种研究”(GY202030)

作者简介:张桂铭,硕士研究生,从事动物病毒相关研究。

通讯作者:杨承槐。E-mail:ychenghuai@163.com

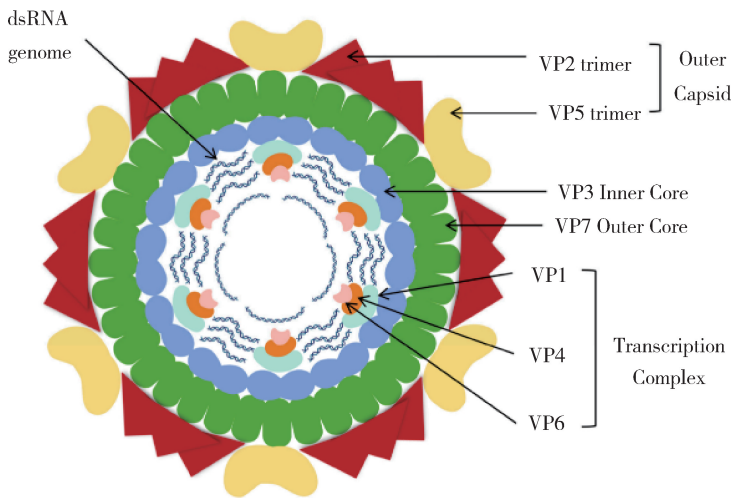
非洲马瘟是由非洲马瘟病毒 (African horse sickness virus, AHSV) 引起的一种主要感染马科动物的非接触性传染病,以发热、皮下水肿及脏器出血为主要临床特征的急性或亚急性传染病^[1]。该病以蚊、库蚊等蚊虫作为传播媒介,感染马匹后病死率可高达 90% 以上,对马业的经济损害巨大。因此,该病被世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, WOAH) 列为法定必须报告的动物疫病。同时,该病是我国一类动物疫病中唯一一个马属动物传染病。非洲马瘟呈季节性地方性流行,主要流行地区在非洲撒哈拉以南,且在夏末最为严重,中东地区也偶有发生^[2]。

2018 年 WOAH 暂停了缅甸和吉尔吉斯斯坦无非洲马瘟区,2020 年泰国和马来西亚发生多起非洲马瘟疫情。老挝、越南等周边国家非洲马瘟流行情况不明朗。因此,非洲马瘟疫情传入我国的风险较高。本文综述了当前 AHSV VP7 蛋白研究进展,以期待为 AHSV 诊断、疫苗等研究提供参考。

1 AHSV 基因组及其编码蛋白

AHSV 属于呼肠孤病毒科环状病毒属,有 9 个血清型 (1 型 ~ 9 型),部分血清型 AHSV 在血清学和疫苗免疫中会出现交叉现象,例如血清型 6 型和 8 型疫苗免疫可分别交叉保护 9 型和 5 型^[3]。AHSV 的病毒粒子是一种结构复杂、高度有序的无囊膜等

距粒子,直径约 80 nm;基因组由十段大小不等的 RNA 片段组成:L1 - 3,M4 - 6,S7 - 10,共编码了 7 种结构蛋白 (VP1 ~ VP7) 和至少 5 种非结构蛋白 (NS1、NS2、NS3、NS3a 和 NS4);最外层由 60 个三脚蛋白体样的 VP2 和 120 个球型 VP5 三聚体构成病毒粒子的外衣壳,它们是主要的分型抗原,决定了病毒的血清型,在不同血清型中 VP2 变异最大,含有诱导产生血清型特异性中和抗体的抗原表位^[4-5];内衣壳由外核心蛋白 VP7 和内核心蛋白 VP3 构成,它们在不同血清型中高度保守;次要内衣壳蛋白由 VP1 (RNA 依赖性的 RNA 聚合酶)、VP4 (加帽酶) 和 VP6 (解旋酶和 ATP 酶) 构成,它们形成花型的转录复合体,贴在 VP3 层,所有 dsRNA 同心层基因组的位于 VP3 层内表面浅槽中的转录复合物周围 (图 1)。5 种非结构蛋白 NS1、NS2、NS3、NS3a 和 NS4 在感染细胞中合成后参与病毒的复制、组装和转运。NS1 和 NS2 在感染细胞中高水平表达,环状病毒感染细胞产生的微管蛋白由 NS1 组成;单链 RNA 结合蛋白 NS2 帮助形成病毒包涵体,该病毒包涵体构成了病毒复制和病毒核心组装的支架;NS3 和 NS3a 在 AHSV 中并不保守,NS3 有助于病毒颗粒从感染细胞中排出。最新的研究表明 NS4 是 AHSV 的重要毒力因子,其可抑制宿主的固有免疫应答^[6]。



AHSV 含有 10 段线性 dsRNA,遗传物质外部由两层壳蛋白包裹,外衣壳由 VP2 和 VP5 组成,VP3 和 VP7 为病毒的内核心蛋白^[7]
 The genome contains 10 segments of linear dsRNA. The gene is covered by two capsid proteins, the outer capsid is composed of VP2 and VP5,
 and VP3 and VP7 are the inner capsid of the virus

图 1 AHSV 病毒粒子模式图

Fig 1 Schematic representation of the AHSV virion

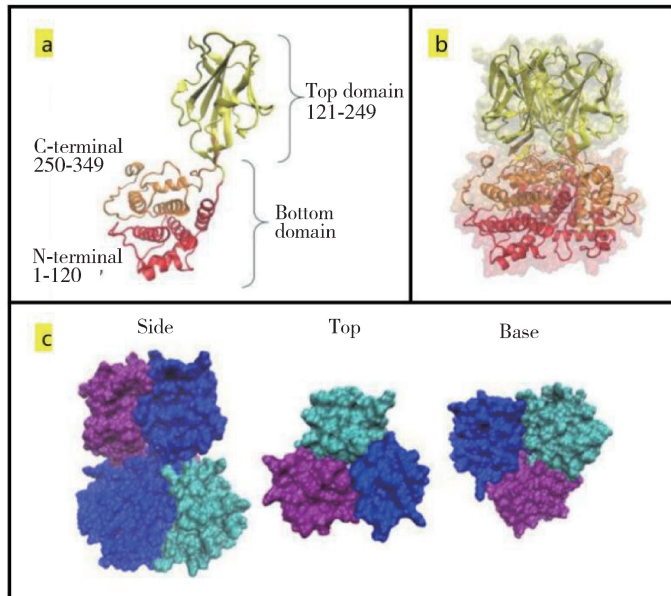
2 VP7 蛋白结构与功能

在 AHSV 中,编码 VP7 蛋白的 S7 基因开放阅读框全长 1050 bp,编码 349 个氨基酸。VP7 蛋白是主要核心蛋白,对病毒的组装和复制过程至关重要;在不同血清型中较为保守,氨基酸的同源性超过 98%^[8-9]。VP7 蛋白序列存在同属环状病毒的保守区段,AHSV 和同属的蓝舌病病毒(Bluetongue virus, BTV)的 VP7 氨基酸序列有较高的同源性,其中氨基端和羧基端的同源性最高,AHSV-4 与 BTV-10 编码 VP7 蛋白质序列中 44% 的氨基酸是相同的,相同位置氨基酸性质的相似度高达 70%^[10]。

2.1 VP7 单体及三聚体结构

VP7 蛋白单体由两

个结构域组成,包含底部一个螺旋状的结构域和顶部一个反向平行的 β 三明治结构域,顶部结构域(121-129aa)由多个反向平行的 β -片层组成,底部结构域由 N 端区域(1-120aa)和 C 端区域(250-239aa)的 9 个 α -螺旋组成(图 2a)。这些结构域通过相互扭转在一起形成三聚体结构(图 2b)。因此,在三聚体中一个 VP7 单体的上结构域位于相邻 VP7 亚基的下结构域上(图 2c)。在单个病毒粒子中,由 780 个 VP7 单体组装成 260 个三聚体,垂直沉积于由 VP3 蛋白包裹病毒基因组和转录复合体的亚核支架上,构成了稳定的二十面体核心粒子^[11-13]。



a: VP7 蛋白单体的上结构域和下结构域的二级结构特征(α -螺旋、反平行 β 片层和扩展环);

b: 由 VP7 蛋白单体构成的三聚体;c: AHSV VP7 三聚体的侧面、顶部和底部图片^[13]

a: Secondary structural features (α -helices, antiparallel β -sheets, and extended loops) of the upper domain and lower domain of the AHSV VP7 monomer; b: AHSV VP7 trimer of VP7 monomers; c: Side, top, and base images of the AHSV VP7 trimer

图 2 VP7 蛋白单体及三聚体结构

Fig 2 The structure of the VP7 monomer and VP7 trimer

2.2 VP7 蛋白功能 在内衣壳蛋白 VP3 存在的情况下,VP7 三聚体会广泛连接组装成二十面体粒子,下螺旋结构域控制着 VP7 晶格的形成以及与 VP3 层的相互作用^[14]。VP7 在病毒核心粒子表面的沉积起到了稳定亚核的作用,单独 VP3 蛋白仅能

形成不稳定的单壳层亚核结构,VP7 蛋白的加入,使 AHSV 核心颗粒变得稳固具有刚性。在病毒组装过程中,VP7 加入到亚核,VP7 蛋白对新包装的 ssRNA 提供必要的稳定和保护作用^[15]。研究表明,在杆状病毒表达系统中同时表达 VP7 和 VP3

蛋白时,蛋白质会自组装成为高度稳定核心样颗粒,VP7 与 VP3 的这种相互作用是自发形成,并不依赖于宿主细胞的作用或非结构蛋白的辅助或指导,VP7 和 VP3 的核样颗粒自组装对于病毒样颗粒疫苗研制具有重要意义^[16-17]。

AHSV 核心颗粒外表面的 VP7 三聚体顶部结构域具有 RGD(Arg - Gly - Asp) 基序,该结构域与整合素配体的识别和病毒粒子与细胞膜的融合有关,推测 AHSV 核心颗粒通过 VP7 上的 RGD 位点附着到整合素而吸附到易感细胞上^[14]。病毒粒子感染机制中 RGD 的作用研究可能有助于研制相应的靶向药物制剂。

AHSV 感染细胞的过程中 VP7 三聚体会组装形成独特的不溶性、扁平的六边形晶体颗粒的特征。推测可能的原因是,在细胞受到感染后激活了宿主细胞的防御机制,蛋白质聚集或错误折叠下形成的晶体样颗粒,以供蛋白酶或自噬进行靶向降解。然而,BTV 的 VP7 三聚体在没有 VP3 蛋白存在的情况下不会发生这种聚集^[18]。体外单独表达 AHSV 的 VP7 蛋白时,也能形成晶体样颗粒。Bekker S 等^[11]尝试采用不同表达系统和不同细胞类型,对 VP7 晶体样颗粒形成进行研究,通过使用 EGFP 标签确定 VP7 蛋白在胞内的分布和运输。结果表明,VP7 晶体的形成会对病毒组装和产量产生负面影响。VP7 的定位不依赖宿主的转运机制,而是 VP7 在病毒核心组装过程中自组装形成高度有序的过程。

在最新的研究报告中,Bekker S^[12]等利用定点突变的方法替换 VP7 三聚体表面残基 276 区的 7 个氨基酸,包括 Pro276His、Arg328Ala、Val333Asn、Ala334Pro、Pro335Met、Val336Pro 和 Gln338Pro,在不影响 VP7 形成稳定三聚体的情况下,VP7 转化为完全可溶性的蛋白,并且其仍然能够与 VP3 相互作用,形成核心样颗粒。另一方面,通过该可溶性 VP7 三聚体可以与 VP3 相互作用形成病毒的核心样颗粒,证明了促进核心样颗粒形成的作用力和 VP7 三聚体之间的作用力并非同一种,并且可溶性的 VP7 三聚体比不溶性的 VP7 更容易与 VP3 相互

作用。因此,突变后产生的可溶性 VP7 蛋白有助于解析 VP7 晶体在细胞感染中的作用,提高病毒核心样颗粒的生产效率,推动 AHSV 的核心样颗粒疫苗的研究。

3 针对 VP7 的检测应用

非洲马瘟根据临床症状分为四种类型,其病理变化和症状与马脑炎等马病的临床体征相似,仅通过临床症状无法确诊,需通过实验室诊断才可确诊。国内外学者针对 AHSV 建立了多种检测方法,包括病原分离、中和试验、RT - PCR、ELISA 和补体结合实验等。其中,VP7 蛋白因其保守性常作为血清群特异性检测靶点,针对 VP7 的检测主要包含对其 S7 序列的核酸检测、VP7 血清抗体的 ELISA 检测方法以及检测 VP7 抗原的双抗夹心 ELISA 方法等。

3.1 基于 VP7 的核酸检测 AHSV 感染急性发病后,马匹往往在未产生能有效检测的抗体滴度便死亡,因此,快速、灵敏的病原检测有助于及早发现并控制疫情的传播。

S7 基因常作为 AHSV 通用的检测位点,国内外建立了基于 S7 通用型的 RT - PCR 和 RT - qPCR^[19],可用于检测感染马匹的器官和血液^[20]。Sailleau C^[21]通过马匹感染试验证实,与病毒分离相比,基于 S7 基因序列的 RT - PCR 的方法更具有时间和灵敏性的优势。近些年,随着荧光定量 PCR 检测方法的不断发展,建立了 S7 序列的荧光定量检测方法,相较普通 RT - PCR,RT - qPCR 具有更好的敏感性、特异性和重复性^[22-23]。此后,又基于 VP7 和 NS2 蛋白基因优化建立了双反转 qPCR,该方法具有高度的特异性,相较 BHK - 21 细胞病毒分离方法,其灵敏度更高^[24]。

我国学者针对 S7 基因的保守序列设计特异性引物和探针建立了多种快速方便的通用型现场检测方法,如环介导等温扩增(RT - LAMP)、反转录重组酶聚合酶扩增(RT - RPA)和逆转录 - 重组酶介导核酸扩增技术(RT - RAA)等^[25-27]。

3.2 基于 VP7 的 ELISA 检测 重组表达的 AHSV VP7 蛋白可作为血清学检测的抗原,可检测 9 个血

清型的抗体,并且可以与同属的环状病毒相区分,具有属特异性^[28]。

最为常见的血清学方法是 ELISA。可采用原核表达系统、杆状病毒表达系统、哺乳动物细胞表达系统和植物表达系统等表达 VP7 蛋白作为包被抗原。2005 年, Maree S 等^[29]通过杆状病毒表达纯化 VP7 重组蛋白晶体建立间接 ELISA 方法,通过使用疫苗免疫后的马血清进行免疫反应动力学验证,表明该方法在早期抗体的检测相较于传统的血清中和试验和补体结合实验更为敏感并且和同属的病毒并无交叉,特异性达到 100%。目前国际上唯一一款商品化的 AHSV 血清抗体检测试剂盒为西班牙英吉纳公司研制的阻断 ELISA 试剂盒,它采用杆状病毒表达系统获得的 AHSV-4 VP7 重组蛋白,此外该公司另一款针对 AHSV 的 ELISA 试剂盒是基于 VP7 单克隆抗体用于检测 VP7 抗原的双夹心试剂盒,该公司的 AHSV 试剂盒在国际上被广泛使用。

郑小龙等^[30]利用制备的多抗建立了 IgM 捕获 ELISA 方法,具有较好的特异性,但相比进口试剂盒存在假阳性。由于 AHSV 的 S7 序列存在环状病毒属的保守序列,因此相较于间接 ELISA,利用 VP7 单克隆抗体建立竞争 ELISA 的特异性会更好^[31]。我国学者利用杆状病毒表达系统制备了针对 VP7 的单克隆抗体,建立了竞争 ELISA 方法^[32]。竞争 ELISA 方法相比间接 ELISA 在背景值、灵敏性和特异性方面均有优势,未来的研究有待筛选出效果更好的单克隆抗体。

3.3 基于 VP7 蛋白的疫苗研究 当前,针对非洲马瘟缺少有效的治疗方法。在疫区国家(如南非等),该病主要是通过预防性疫苗接种、监测、分区来控制该病。目前预防接种的疫苗是多价减毒活疫苗,但该疫苗能引起马匹出现病毒血症等副反应,且存在基因重组导致的毒力返强风险。因此,需要研究一款安全、经济且对多价血清型具有免疫保护力的疫苗。

VP7 是 AHSV 的血清群特异性蛋白,为候选亚单位疫苗和病毒样颗粒疫苗的组成部分。VP7 三

聚体自发形成的扁平六边形的晶体样颗粒,可能具有大量的重复性的重要免疫表位,进而增强体液和细胞介导的免疫应答,此外,抗原提呈细胞在处理 VP7 类晶体微粒方面比可溶性抗原更有优势。基于 VP7 蛋白制备的亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗均不含有核酸,安全性好,且可区分野毒感染和疫苗免疫^[33]。

VP7 不是主要的中和抗体靶点,但研究表明接种不溶性 AHSV VP7 晶体的小鼠,能抵抗致死剂量的 AHSV 强毒攻击^[34]。在缺乏 VP7 的情况下,单一的 VP2 或 VP5 与 VP2 重组蛋白,免疫马匹并未成功诱导中和抗体,无法产生免疫保护作用^[35],由此可见,VP7 在疫苗免疫保护中起到了重要的作用。

病毒样颗粒疫苗对比亚单位疫苗有更好的免疫原性的优势。应用重组杆状病毒表达系统共表达 VP3 和 VP7,在昆虫细胞中形成与 AHSV 相似的核心样颗粒,但其并未达到期待的免疫效果^[36]。后续研究表明,VP3 和 VP7 核心样颗粒形成后,需在衣壳蛋白 VP2 和 VP5 辅助下实现了病毒样颗粒的组装,说明 VP2 和 VP5 是装配病毒样颗粒必须的,但是病毒样颗粒的产量却较少^[37],推测其可能与前述的 VP7 的不溶性有关。较低的产量和使用细胞表达的成本一直限制着这种疫苗的研究和商业化应用。随着最近经过修饰的可溶性 VP7 的研究进展,有望解决病毒样颗粒的产量,此外,对于该可溶性 VP7 亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗的免疫原性同样需要进一步评估。

Shelley 等^[36]采用植物表达载体表达出 VP7 晶体重组蛋白,豚鼠接种后,诱导了体液和细胞免疫反应,发现该蛋白具有较好的免疫原性,但缺乏在马匹体内实验数据。Dennis 等^[38-39]通过植物表达 AHSV 的四种衣壳蛋白(VP7、VP3、VP5 和 VP2)生产 AHSV-5 型的病毒样颗粒,不仅生产过程快速、简单、经济成本低并且制备的豚鼠抗血清被证明可中和病毒,是植物生产 AHSV 的病毒样颗粒疫苗的首份报告,随后的马匹试验验证它具有一定的免疫保护力。2021 年,通过 Western 免疫印迹和 RNA-seq

转录组分析,以豚鼠为模型评估了用植物生产的 AHSV VP7 晶体激发全身性免疫反应,包括体液免疫和细胞免疫,结果表明其激发了豚鼠的适应性免疫。由于该实验中的样本量太少,需要进一步采用更大的样品量来评估植物生产的 VP7 晶体作为候选 AHSV 候选疫苗的免疫应答适用性^[37]。目前来看,植物表达载体生产 AHSV 的病毒样颗粒新型疫苗具有较大的研究潜力。

4 总 结

非洲马瘟对于马业的破坏性巨大,世界各国主要采取严格检疫避免非洲马瘟的传入。我国是 WOA 认可的非洲马瘟无疫国,面对东南亚出现的非洲马瘟疫情,加强海关口岸马匹及其相关制品的检疫是重中之重。我国的非洲马瘟诊断技术标准中有病毒分离、普通 RT-PCR、间接 ELISA、补体结合反应等方法。国际上针对 AHSV 的抗体试剂盒也是由西班牙英吉纳公司研制,我国针对 AHSV 的检测试剂依赖进口。作为 WOA 认可的非洲马瘟无疫国,为加强检测避免非洲马瘟的传入,应首先针对通用型 VP7 蛋白作为检测位点建立检测技术标准。针对 AHSV 病原建立的通用型 RT-qPCR 已在国外的疫情检测中证明有效,被 WOA 作为推荐的检测方法,应对 AHSV 的 RT-qPCR 检测方法进行评估验证并进行标准确定。另一方面,针对 AHSV VP7 蛋白的双抗夹心 ELISA 方法和针对 VP7 抗血清的竞争 ELISA 国际市场上均有较好的研究结果,后续应利用单抗制备技术筛选出特异性较好的单克隆抗体,为 AHSV 检测方法建立技术储备。此外,VP7 蛋白上已经证实的有两个 B 细胞表位,重组 VP7 蛋白的表达是制备 ELISA 试剂盒的理想抗原。

VP7 蛋白的功能研究有助于靶向药物的研发,对于非经济动物马匹的治疗具有一定的价值。针对 VP7 相关的 AHSV 疫苗主要有亚单位疫苗和病毒样颗粒疫苗,已证明了多蛋白的病毒样颗粒疫苗的免疫效果大于亚单位疫苗。通过植物表达系统生产的 AHSV 病毒样颗粒疫苗具有低生产成本的优点,但其免疫保护力有待进一步验证,通过真核

系统表达的病毒样颗粒疫苗的生产效率过低,但随着最近可溶性 VP7 的研究或将改善病毒样颗粒疫苗产量及效率的问题,病毒样颗粒疫苗的发展或将迎来阶段性的突破。目前,鉴于 AHSV 在东南亚的传播已经严重威胁到我国马匹产业的健康,我国应首先针对安全性较高的灭活疫苗进行评估,以便出现疫情启用建立免疫带,同时加强多种 AHSV 新型疫苗深入研究以便未来消灭非洲马瘟。

参考文献:

- [1] Mellor P S, Hamblin C. African horse sickness[J]. *Veterinary Research*, 2004, 35(4): 445-466.
- [2] Mellor P S. African horse sickness: transmission and epidemiology [J]. *Veterinary Research*, 1993, 24(2): 199-212.
- [3] Von Teichman B F, Dungu B, Smit T K. *In vivo* cross-protection to African horse sickness Serotypes 5 and 9 after vaccination with Serotypes 8 and 6 [J]. *Vaccine*, 2010, 28(39): 6505-6517.
- [4] Burrage T G, Trevejo R, Stone-Marschat M, et al. Neutralizing epitopes of African horsesickness virus serotype 4 are located on VP2[J]. *Virology*, 1993, 196(2): 799-803.
- [5] Martínez-Torrecuadrada J L, Langeveld J P, Venteo A, et al. Antigenic profile of African horse sickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus [J]. *Virology*, 1999, 257(2): 449-459.
- [6] Wall G V, Wright I M, Barnardo C, et al. African horse sickness virus NS4 protein is an important virulence factor and interferes with JAK-STAT signaling during viral infection [J]. *Virus Research*, 2021, 298: 198407.
- [7] Dennis S J, Meyers A E, Hitzeroth I I, et al. African Horse Sickness: A Review of Current Understanding and Vaccine Development[J]. *Viruses*, 2019, 11(9): E844.
- [8] Zientara S, Weyer C T, Lecollinet S. African horse sickness[J]. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 2015, 34(2): 315-327.
- [9] Iwata H, Yamagawa M, Roy P. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horse sickness, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences[J]. *Virology*, 1992, 191(1): 251-261.

- [10] Roy P, Hirasawa T, Fernandez M, *et al.* The complete sequence of the group – specific antigen, VP7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus[J]. *The Journal of General Virology*, 1991, 72 (Pt 6): 1237 – 1241.
- [11] Bekker S, Huismans H, Van Staden V. Factors that affect the intracellular localization and trafficking of African horse sickness virus core protein, VP7 [J]. *Virology*, 2014, 456 – 457: 279 – 291.
- [12] Bekker S, Huismans H, Van Staden V. Generation of a Soluble African Horse Sickness Virus VP7 Protein Capable of Forming Core – like Particles[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1624.
- [13] Bekker S, Burger P, Van Staden V. Analysis of the three – dimensional structure of the African horse sickness virus VP7 trimer by homology modelling[J]. *Virus Research*, 2017, 232: 80 – 95.
- [14] Basak A K, Gouet P, Grimes J, *et al.* Crystal structure of the top domain of African horse sickness virus VP7: comparisons with bluetongue virus VP7[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(6): 3797 – 3806.
- [15] Matsuo E, Roy P. Minimum requirements for bluetongue virus primary replication *in vivo* [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(2): 882 – 889.
- [16] Maree S, Durbach S, Huismans H. Intracellular production of African horsesickness virus core – like particles by expression of the two major core proteins, VP3 and VP7, in insect cells[J]. *The Journal of General Virology*, 1998, 79 (Pt 2): 333 – 337.
- [17] French T J, Roy P. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(4): 1530 – 1536.
- [18] Loudon P T, Roy P. Assembly of five bluetongue virus proteins expressed by recombinant baculoviruses: inclusion of the largest protein VP1 in the core and virus – like proteins [J]. *Virology*, 1991, 180(2): 798 – 802.
- [19] 赵文华, 杨仕标, 王金萍, 等. 非洲马瘟病毒群特异性 RT – PCR 检测方法的研究 [J]. *生物技术通报*, 2011 (4): 204 – 207.
- Zhao W H, Yang S B, Wang J P, *et al.* Development of RT – PCR method for detection of AHSV [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(4): 204 – 207.
- [20] Stone – Marschat M, Carville A, Skowronek A, *et al.* Detection of African horse sickness virus by reverse transcription – PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32 (3): 697 – 700.
- [21] Sailleau C, Moulay S, Cruciere C, *et al.* Detection of African horse sickness virus in the blood of experimentally infected horses: comparison of virus isolation and a PCR assay [J]. *Research in Veterinary Science*, 1997, 62(3): 229 – 232.
- [22] Agüero M, Gómez – Tejedor C, Angeles Cubillo M, *et al.* Real – time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2008, 20(3): 325 – 328.
- [23] Guthrie A J, Maclachlan N J, Joone C, *et al.* Diagnostic accuracy of a duplex real – time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 189(1): 30 – 35.
- [24] Quan M, Lourens C W, MacLachlan N J, *et al.* Development and optimisation of a duplex real – time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167(1): 45 – 52.
- [25] 史卫军, 林彦星, 黄超华, 等. 非洲马瘟病毒实时荧光 RT – RPA 快速检测方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(7): 119 – 123.
- Shi W L, Lin Y X, Huang C H, *et al.* Development of a real – time RT – RPA assay for rapid detection of African horse sickness virus [J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39(7): 119 – 123.
- [26] 梅明珠, 陈茹, 刘志玲, 等. 非洲马瘟病毒 RT – RAA 快速检测方法的建立 [J]. *中国口岸科学技术*, 2022, 4(7): 45 – 51.
- Mei M Z, Chen R, Liu Z L, *et al.* Establishment of a novel RT – RAA fluorescence assay for African horse sickness virus [J]. *China Port Science and Technology*, 2022, 4(7): 45 – 51.
- [27] 李富祥, 赵文华, 杨仕标. 非洲马瘟病毒可视化 RT – LAMP 现场检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(6): 579 – 583.
- Li F X, Zhao W H, Yang S B. Development of a visual reverse transcription loop – mediated isothermal amplification assay for field detection of the African horse sickness virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(6): 579 – 583.
- [28] Chuma T, Le Blois H, Sánchez – Vizcaíno J M, *et al.* Expression of the major core antigen VP7 of African horsesickness

- virus by a recombinant baculovirus and its use as a group - specific diagnostic reagent[J]. *The Journal of General Virology*, 1992, 73 (Pt 4): 925 - 931.
- [29] Maree S, Paweska J T. Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7 - based indirect ELISA for the detection of group - specific IgG antibodies in horse sera[J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 125(1): 55 - 65.
- [30] 郑小龙, 朱来华, 王群, 等. 非洲马瘟 VP7 蛋白多克隆抗体的制备及 IgM 捕获 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2014, 31(5): 70 - 73.
- Zheng X L, Zhu L H, Wang Q, *et al.* Preparation of polyclonal antibody against protein VP7 of African horse sickness virus and development of IgM capture enzyme - linked immunosorbent assay for detecting African horse sickness[J]. *China Animal Health Inspection*, 2014, 31(5): 70 - 73.
- [31] Kweon C H, Kwon B J, Ko Y J, *et al.* Development of competitive ELISA for serodiagnosis on African horsesickness virus using baculovirus expressed VP7 and monoclonal antibody [J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 113(1): 13 - 18.
- [32] 杜方原, 冯春燕, 王彩霞, 等. 抗非洲马瘟 VP7 蛋白的小鼠单克隆抗体制备及其鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(12): 1125 - 1129.
- Du F Y, Feng C Y, Wang C X, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against African horse sickness virus VP7 [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2018, 34(12): 1125 - 1129.
- [33] 户鑫兵, 高闪电, 田占成, 等. 非洲马瘟病毒 VP7 蛋白在昆虫细胞中的表达及其抗体制备[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(3): 317 - 323.
- Hu X B, Gao S D, Tian Z C, *et al.* Expression of African horse sickness virus VP7 protein in insect cells and preparation of its polyclonal antibodies[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(3): 317 - 323.
- [34] Wade - Evans A M, Pullen L, Hamblin C, *et al.* African horsesickness virus VP7 sub - unit vaccine protects mice against a lethal, heterologous serotype challenge [J]. *The Journal of General Virology*, 1997, 78 (Pt 7): 1611 - 1616.
- [35] Martínez - Torrecuadrada J L, Díaz - Laviada M, Roy P, *et al.* Full protection against African horse sickness (AHS) in horses induced by baculovirus - derived AHS virus serotype 4 VP2, VP5 and VP7[J]. *The Journal of General Virology*, 1996, 77 (Pt 6): 1211 - 1221.
- [36] Fearon S H, Dennis S J, Hitzeroth I I, *et al.* Humoral and cell - mediated immune responses to plant - produced African horse sickness virus VP7 quasi - crystals[J]. *Virus Research*, 2021, 294: 198284.
- [37] Maree S, Maree F F, Putterill J F, *et al.* Synthesis of empty african horse sickness virus particles[J]. *Virus Research*, 2016, 213: 184 - 194.
- [38] Dennis S J, Meyers A E, Guthrie A J, *et al.* Immunogenicity of plant - produced African horse sickness virus - like particles: implications for a novel vaccine[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 442 - 450.
- [39] Dennis S J, O' Kennedy M M, Rutkowska D, *et al.* Safety and immunogenicity of plant - produced African horse sickness virus - like particles in horses[J]. *Veterinary Research*, 2018, 49(1): 105.

(编辑:李文平)