

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.03

不同抗原对猪瘟病毒抗体 ELISA 检测效果的影响

曾小宇¹, 苗银萍¹, 赵冰琳², 魏卓¹, 赵林萍^{3*}

(1. 郑州中道生物技术有限公司, 郑州 450000; 2. 河南中标检测服务有限公司, 郑州 450000;

3. 郑州大学生命科学学院, 郑州 450000)

[收稿日期] 2017-03-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 06-0019-08 [中图分类号] S852.651

[摘要] 为研究不同抗原对猪瘟病毒抗体 ELISA 检测效果的影响,通过原核表达获取猪瘟病毒重组 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白,大小分别约为 35、42、16 和 80 kD。经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化并利用 BandScan 软件进行计算,纯度均在 90% 以上,满足 ELISA 检测包被用原料纯度的要求。将上述 4 种蛋白作为包被抗原进行 ELISA,以 10 份企业阳性质控品血清和 10 份企业阴性质控品血清为检验指标比较不同抗原对猪瘟病毒抗体 ELISA 检测效果的影响。结果以 E2 蛋白为原料的包被板检测质控血清时,灵敏度和特异性均达到 80% 以上,能够满足猪瘟病毒抗体 ELISA 检测的要求,故选择 E2 蛋白作为包被抗原并进行相关检测试剂的研制。用研制的试剂与国际知名度高、产品质量好的美国 IDEXX 同类试剂对 432 份临床猪血清进行符合性检测,结果与美国 IDEXX 试剂的阳性符合率为 95.53%,阴性符合率为 86.56%,总符合率为 91.67%,两种试剂检测结果具有较高的一致性。试验表明,用 E2 蛋白为包被抗原对猪瘟病毒抗体进行 ELISA 检测的效果最好,制备的检测试剂可用于临床猪瘟病毒血清抗体的检测,为今后猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂的进一步研制奠定了基础。

[关键词] ELISA; 检测效果; 原核表达; E2 蛋白

Effects of Different Antigens on ELISA Detecting Efficiency for the Antibody of Classical Swine Fever Virus

ZENG Xiao-yu¹, MIAO Yin-ping¹, ZHAO Bing-lin², WEI Zhuo¹, ZHAO Lin-ping^{3*}

(1. Zhengzhou Zhongdao Biotech Co Ltd, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan Zhongbiao Testing Service Co Ltd, Zhengzhou 450000, China;

3. School of Life Sciences Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Corresponding author: ZHAO Lin-ping, E-mail: zlp369@vip.163.com

Abstract: To understand the effects of different antigens on ELISA detecting efficiency for the antibody of classical swine fever virus (CSFV), the recombinant E2 protein, E0 protein, C protein and NS5B protein of CSFV were obtained by prokaryotic expression which were about 35, 42, 16 and 80 kD. These proteins were purified by using Ni-NTA affinity chromatographic column. The purity of the raw materials calculated by

作者简介: 曾小宇, 硕士, 工程师, 从事动物疫病诊断试剂的研发与生产。

通讯作者: 赵林萍。E-mail: zlp369@vip.163.com

BandScan software was suitable for ELISA detection. The ELISA was carried on by using four proteins above as coating antigens. The effect of ELISA detection result for CSFV antibody by using different antigens was compared through ten samples of CSFV-positive sera and ten samples of CSFV-negative sera from company. The result showed that the sensitivity and specificity of reagent can reach more than 80% by using E2 protein as the raw material which was coated to detecting the control sera. Therefore, E2 protein was satisfied for CSFV antibody ELISA detection. As the results, E2 protein was treated as the coating antigen to developing ELISA reagent. The positive coincidence rate, negative coincidence rate and total coincidence rate of developed reagent were 95.53%, 86.56% and 91.67%, compared to IDEXX reagent with high popularity and good quality internationally from United States on 432 samples of pig clinical samples. In a word, the ability to detect the CSFV antibody from IDEXX and our company were almost the same. The results indicated that it's the best effect of ELISA detection result for CSFV antibody by using E2 protein as coating antigen. This reagent can be used for the detection of pig clinical sera, which laid the foundation for the further study of the detection reagent in ELISA.

Key words: ELISA; detecting efficiency; prokaryotic expression; E2 protein

猪瘟是危害我国养猪业的主要传染病之一,广泛存在于全世界范围内,具有发病急、发病快的特点,给养猪生产造成了严重的经济损失^[1-2]。目前,对该病尚无有效的治疗药物,疫苗免疫是唯一有效预防该病的手段^[3-5],因此定期开展免疫猪场的抗体监测对防控猪瘟疫病具有重大的意义。

目前用于猪瘟病毒抗体检测的方法有病毒中和试验和 ELISA 试验,其中病毒中和试验包括荧光抗体病毒中和试验(FAVN)和过氧化物酶联中和试验(NPLA),这两种方法具有特异性强,灵敏度高等优点,均为国际贸易指定方法^[6]。由于病毒中和试验涉及到病毒培养,对实验室和从业人员的要求高,存在散毒的风险,且每批次检测样本的数量有限,仅用于对可疑样本进行确诊,不宜进行大量样本的普查工作^[7]。ELISA 试验方法简便,易于操作,能对样本进行批量检测,同时具有较强的敏感度和特异性,基于以上优点,以 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白 4 种猪瘟病毒蛋白为包被抗原进行比较,筛选出效果最好的一种蛋白作为包被抗原进行猪瘟病毒抗体检测试剂的初步研制,为该检测试剂的进一步研制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床猪血清 432 份 来自河南省南阳市某

养殖场,每份 5 mL~10 mL 不等。

1.1.2 对照试剂盒 美国 IDEXX 公司猪瘟病毒抗体检测试剂盒,批号:E331,购自北京爱德士元亨生物技术有限公司。

1.1.3 企业质控品血清 经由 IDEXX 对照试剂对大量临床血清进行筛查,挑选出阳性样本和阴性样本各 10 份,挑选后再用 IDEXX 对照试剂进行 3 次重复检测,确定 10 份阳性质控品血清的检测结果为阳性,10 份阴性质控品血清的检测结果为阴性。阳性质控品血清编号 P1-P10,阴性质控品血清编号 N1-N10。

1.1.4 毒种 猪瘟活疫苗(细胞源),兔化弱毒株(CVCCAV1412),批号:130101CA,购自洛阳普莱克生物技术有限公司。

1.1.5 菌株及载体 感受态 *E.coli* DH5 α 、感受态 *E.coli* BL21(DE3)和载体 pET32a,均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.6 酶标板 批号:AT2922160613,购自厦门市云鹏科技发展有限公司,抗原吸附用的固相载体。

1.1.7 其他试剂 BSA,批号:160905,纯度 $\geq 96\%$,500 g/袋,购自盐城赛宝生物科技有限公司,用于抗原包被板的封闭;HRP 标记鼠抗猪 IgG,批号:20160501,10 mL/瓶,购自洛阳佰奥通实验材料中心,用于酶标二抗工作液的配制;TMB · 2HCl ·

2H₂O,批号:710501102,纯度≥98%,5 g/瓶,购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,用于显色底物的配制;硫酸,批号 161121,分析纯,500 mL/瓶,购自上海振企化学试剂有限公司,用于终止液的配制。*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I 和 *Xho* I 限制性内切酶,均购自宝生物工程(大连)有限公司。LB 培养基,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.8 仪器 TP650 PCR 仪,购自宝生物工程(大连)有限公司;DYY-8C 电泳仪,购自上海市大一仪器厂;MK3 酶标仪,购自赛默飞;电热恒温培养箱,购自北京中兴伟业仪器有限公司;TGL-16M 高速台式冷冻离心机,购自湖南湘仪离心机仪器有限公司;数显气浴恒温振荡器,购自常州普天仪器制造有限公司;Tanon 1600 凝胶成像系统,购自上海天能公司。

1.2 方法

1.2.1 猪瘟病毒 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白的制备方法^[8]

1.2.1.1 引物的设计与合成 根据猪瘟兔化弱毒株基因序列,分别设计合成用于扩增猪瘟病毒 E2 基因、E0 基因、C 基因和 NS5B 基因的引物,并在上下游引物中分别引入酶切位点和保护性碱基,引物 5'端前三位是保护性碱基,斜体部分是限制性内切酶酶切位点。引物序列如下:

E2 基因上游引物:

5'-TTTGGATCCCGCTAGCCTGCAAGGAAGA-3'

E2 基因下游引物:

5'-TATAAGCTTGTGAAGTCGAAGCCACACC-3'

E0 基因上游引物:

5'-TTTGAATTCATGTTGTACCAACCAGTTG-3'

E0 基因下游引物:

5'-TTTCTCGAGGGTGCAGTTGTTAGTGTACC-3'

C 基因上游引物:

5'-TTTGGATCCTCCGATGATGGCGCAAGTGG-3'

C 基因下游引物:

5'-TTTAAGCTTGGCTTCAACTGGTTGGTACA-3'

NS5B 基因上游引物:

5'-TTTGAATTCAGTAATTGGGTGATGCAAGA-3'
NS5B 基因下游引物:

5'-TTTCTCGAGTGGCCCTCTCCCTATCAGCG-3'

E2 基因和 C 基因酶切位点是 *Bam*H I 和 *Hind* III, E0 基因和 NS5B 基因酶切位点是 *Eco*R I 和 *Xho* I。

1.2.1.2 4 种基因片段的扩增 提取猪瘟兔化弱毒株中的 RNA,经反转录后,分别用 4 种特异性引物扩增目的片段。

1.2.1.3 4 种基因重组表达质粒的构建 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶分别酶切 E2 基因、C 基因和表达质粒 pET32a,同时用 *Eco*R I 和 *Xho* I 限制性内切酶分别酶切 E0 基因、NS5B 基因和表达质粒 pET32a。将酶切后的基因和表达质粒按一定比例连接,连接产物转化至感受态 *E.coli* DH5α 中。经 PCR 鉴定、酶切鉴定后获取 4 种重组表达质粒,分别为 pET32a-E2、pET32a-E0、pET32a-C 和 pET32a-NS5B。

1.2.1.4 4 种重组蛋白的诱导表达与纯化 分别将重组表达质粒转化至感受态 *E.coli* BL21(DE3) 中,用 IPTG 诱导表达,超声破菌 30 min。经 SDS-PAGE 鉴定,挑选出阳性表达菌株进行大批量诱导表达。用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组蛋白。

1.2.2 猪瘟病毒抗体 ELISA 检测方法的建立

1.2.2.1 操作方法 采用间接 ELISA 法原理^[9],将蛋白抗原按 20 ng/孔包被到酶标板上,经 2℃~8℃ 过夜吸附,次日将包被板中未吸附的抗原包被液洗去,再用 10% 的 BSA 溶液进行封闭,2℃~8℃ 封闭 12 h,洗去封闭液,37℃ 烘烤至干。将待检样品加入到抗原包被板中,37℃ 温育 30 min,洗涤 5 次后加入酶标二抗,37℃ 温育 30 min,洗涤 5 次后加入显色底物,37℃ 温育 10 min,加入终止液终止显色反应。若待检样品中含有猪瘟病毒抗体,则与包被板中的包被抗原结合形成抗原-抗体免疫复合物被固定在酶标板上,并与随后加入的酶标记抗猪 IgG 形成“固相抗原-抗体-抗猪抗体-HRP”免疫复合物,洗涤后,加入显色剂即显色,为阳性,反之为阴性。

1.2.2.2 结果判定 参考相关文献^[10-11],阴性标本

2.1 倍处的 OD 值是线性的中间点,此点比较敏感和稳定。故以阴性对照 OD 值的 2.1 倍为临界值,若待检样本的 OD 值 $\geq$ 临界值,结果判为阳性;若待检样本的 OD 值 $<$ 临界值,结果判为阴性。

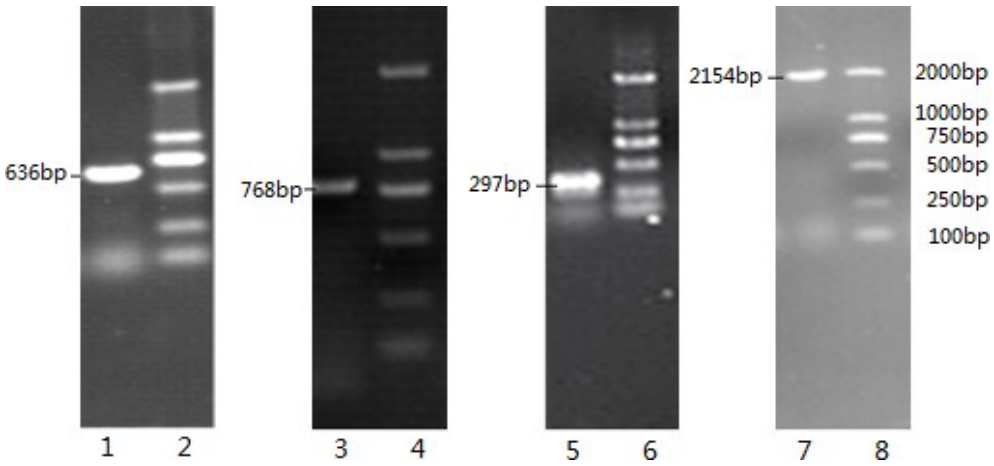
1.2.2.3 4 种包被蛋白的筛选 将原核表达获取的猪瘟疫病毒重组 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白分别进行包被,以 10 份企业阳性质控品血清和 10 份企业阴性质控品血清为检验指标,筛选出最合适的包被原料。

1.2.2.4 与美国 IDEXX 同类试剂进行符合性试验

分别用郑州中道生物技术有限公司初步研制的猪瘟病毒抗体检测试剂(以下简称“中道试剂”)和美国 IDEXX 同类试剂检测 432 份临床猪血清,并进行符合率比较,计算阳性符合率、阴性符合率和总符合率。

2 结果与分析

2.1 4 种基因片段的 RT-PCR 扩增结果 经 RT-PCR 扩增,获得大小为 636 bp、768 bp、297 bp 和 2154 bp 的目的片段(图 1),与预计 E2 基因、E0 基因、C 基因和 NS5B 基因大小一致。



1: E2 基因;2,4,6 和 8: DNA Marker DL 2000;3: E0 基因;5: C 基因;7: NS5B 基因
1: E2 gene; 2, 4, 6 and 8: DNA Marker DL2000; 3: E0 gene; 5: C gene; 7: NS5B gene

图 1 4 种基因片段的 RT-PCR 扩增

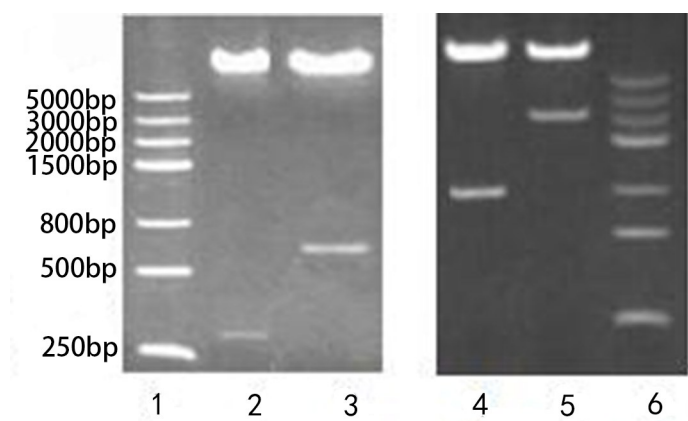
Fig 1 RT-PCR amplification of four gene products

2.2 4 种基因重组表达质粒的构建 重组质粒经 RT-PCR 鉴定,均获得与目的基因大小一致的片段。分别用相应的限制性内切酶作用,然后将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 2。由图可见,酶切后均出现与目的片段大小一致的条带和预期大小的载体。

2.3 4 种蛋白的诱导表达与纯化 经 IPTG 诱导 2 h 后,重组蛋白获得表达,SDS-PAGE 电泳图可见,重组 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白大小分别约为 35、42、16 和 80 kD(图 3 中的 2,5,8 和 11)。挑

选阳性重组菌进行大批量诱导表达,超声破菌,用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,纯化后蛋白(图 3 中的 3,6,9 和 12)经 BandScan 软件计算,纯度分别为 95%、90%、91%和 92%,满足 ELISA 检测包被用原料纯度的要求。

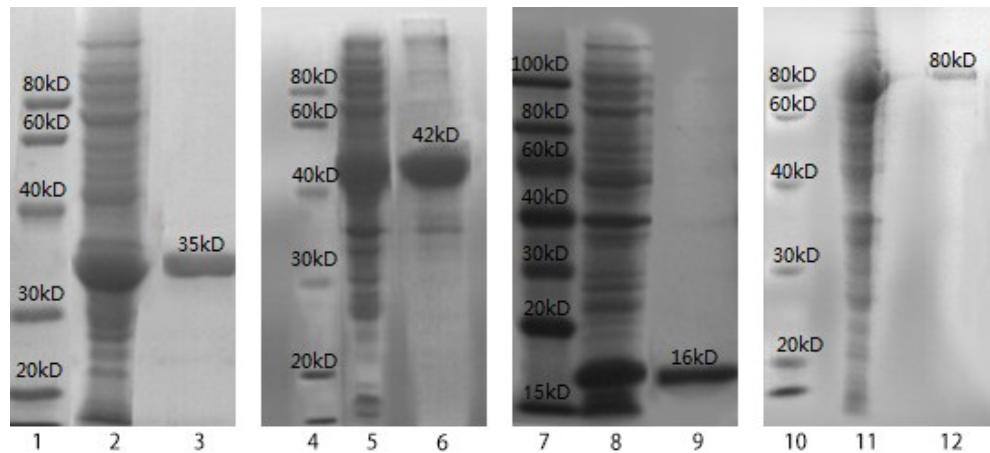
2.4 4 种包被蛋白检测企业质控品血清的结果 将 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白分别进行包被,检测 10 份企业阳性质控品血清, P1-P10, 结果见表 1。检测 10 份企业阴性质控品血清, N1-N10, 结果见表 2。



1, 6: DNA Marker DL 5000; 2: pET32a-C 酶切产物; 3: pET32a- E2 酶切产物;
4: pET32a- E0 酶切产物; 5: pET32a-NS5B 酶切产物
1, 6: DNA Marker DL 5000; 2: pET32a-C digested product; 3: pET32a- E2 digested product;
4: pET32a- E0 digested product; 5: pET32a-NS5B digested product

图 2 重组表达质粒酶切鉴定

Fig 2 Enzyme identification of recombinant expression plasmids



1, 4, 10: 蛋白 Marker 80 kD; 2: pET32a- E2/BL21(DE3)诱导后; 3: 纯化后 E2 蛋白; 5: pET32a- E0/BL21(DE3)诱导后;
6: 纯化后 E0 蛋白; 7: 蛋白 Marker 100 kD; 8: pET32a- C/BL21(DE3)诱导后; 9: 纯化后 C 蛋白;
11: pET32a- NS5B/BL21(DE3)诱导后; 12: 纯化后 NS5B 蛋白
1, 4, 10: Protein Marker 80 kD; 2: pET32a- E2/BL21(DE3)with induction; 3: target protein E2 after purification;
5: pET32a- E0/BL21(DE3)with induction; 6: target protein E0 after purification; 7: Protein Marker 100 kD;
8: pET32a- C/BL21(DE3)with induction; 9: target protein C after purification;
11: pET32a- NS5B/BL21(DE3)with induction; 12: target protein NS5B after purification

图 3 4 种重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 3 SDS-PAGE identification of four recombinant proteins

表 1 4 种猪瘟病毒蛋白分别作为包被抗原检测 10 份企业阳性质控品血清结果

Tab 1 The results of ten positive quality control sera detected by four kinds of swine fever virus proteins											
包被原料	临界值	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
E2	0.179	0.354	0.390	0.052	0.784	0.691	0.489	0.998	1.587	1.227	1.998
		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
E0	0.221	0.045	0.101	0.087	0.435	1.645	0.056	0.741	0.113	1.057	1.524
		-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
C	0.200	0.578	0.647	0.746	0.827	1.267	0.154	1.645	1.087	1.285	0.798
		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
NS5B	0.183	0.057	0.068	0.078	0.095	0.104	0.082	0.062	1.045	0.924	0.045
		-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

P1-P10 为 10 份阳性质控品血清编号。P1-P10 酶标仪检测结果在表中用数值表示,判定结果用 "+" 和 "-" 表示。"+" 表示检测结果大于临界值,为阳性;"-" 表示检测结果小于临界值,为阴性

P1-P10 is the number of ten positive quality control sera. The instrument test results of P1-P10 were indicated by numerical values. The determination results of P1-P10 were indicated by symbol "+" and "-". If the determination results were greater than the critical value, symbol "+" was used. If the determination results were less than the critical value, symbol "-" was used

表 2 4 种猪瘟病毒蛋白分别作为包被抗原检测 10 份企业阴性质控品血清结果

Tab 2 The results of ten negative quality control sera detected by four kinds of swine fever virus proteins											
包被原料	临界值	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
E2	0.179	0.041	0.067	0.052	0.104	0.451	0.081	0.462	0.057	0.068	0.072
		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
E0	0.221	0.057	1.201	0.175	0.852	0.137	0.964	0.120	0.843	0.107	0.098
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
C	0.200	1.451	0.957	0.628	0.751	0.657	0.154	0.354	0.741	0.052	0.898
		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
NS5B	0.183	0.147	0.056	0.098	0.104	0.058	0.064	0.089	0.163	0.087	0.093
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N1-N10 为 10 份阴性质控品血清编号。N1-N10 酶标仪检测结果用数值表示,判定结果用 "+" 和 "-" 表示。"+" 表示检测结果大于临界值,为阳性;"-" 表示检测结果小于临界值,为阴性

N1-N10 is the number of ten negative quality control sera. The instrument test results of N1-N10 were indicated by numerical values. The determination results of N1-N10 were indicated by symbol "+" and "-". If the determination results were greater than the critical value, symbol "+" was used. If the determination results were less than the critical value, symbol "-" was used

由表1和表2可见,采用E2蛋白作为原料进行包被,10份阳性质控品血清检测出9份为阳性结果,灵敏度为90%,10份阴性质控品血清检测出8份为阴性结果,特异性为80%;采用E0蛋白作为原料进行包被,阳性质控品血清检测出5份为阳性,阴性质控品血清检测出6份为阴性,其灵敏度与特异性均在50%附近,说明用E0蛋白包被进行样本检测时存在很大的随机性;采用C蛋白作为原料进行包被,虽然阳性质控品血清检测出9份为阳性,但阴性质控品

血清检测出8份为阳性结果,说明该蛋白存在很严重的非特异性结合,特异性效果很差;采用NS5B蛋白作为原料进行包被,检测的质控品血清基本为阴性,说明该蛋白的捕获能力很弱,不能满足猪瘟病毒抗体ELISA检测的要求。故采用E2蛋白作为包被原料进行猪瘟病毒抗体检测试剂的初步研制。

2.5 与美国IDEXX同类试剂进行符合性检测的结果

分别用中道试剂与美国IDEXX同类试剂对432份临床猪血清进行符合性检测,结果见表3。

表 3 两种试剂检测 432 份临床猪血清样本的数据统计

Tab 3 The data statistics of pig clinical 432 samples of sera detected by two kinds of reagents

中道试剂	IDEXX 试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	235 (A)	25 (B)	260 (A+B)
阴性	11 (C)	161 (D)	172 (C+D)
合计	246 (A+C)	186 (B+D)	432 (A+B+C+D)

表 3 中 A 区域表示两种试剂均检测为阳性结果;B 区域表示中道试剂检测为阳性结果, IDEXX 试剂检测为阴性结果;C 区域表示中道试剂检测为阴性结果, 美国 IDEXX 试剂检测为阳性结果;D 区域表示两种试剂均检测为阴性结果。以 IDEXX 试剂作为参考, 中道试剂与之比较的结果为: 阳性符合率为 $A/(A+C) \times 100\% = 95.53\%$; 阴性符合率为 $D/(B+D) \times 100\% = 86.56\%$; 总符合率为 $(A+D)/(A+B+C+D) \times 100\% = 91.67\%$ 。由此可见中道试剂与美国 IDEXX 同类试剂具有较高的一致性, 能用于临床猪瘟病毒血清抗体的检测。

3 小结与讨论

与细胞培养病毒相比, 原核表达系统具有易于控制、成本低、不需要大量的人力物力、不会出现散毒等优点; 与真核表达系统相比, 原核表达系统具有操作简单、易于控制、蛋白表达量多、成本低等优点。故本文通过原核表达获取重组猪瘟病毒 E2 蛋白、E0 蛋白、C 蛋白和 NS5B 蛋白, 大小分别约为 35、42、16 和 80 kD。经过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化并利用 BandScan 软件计算, 纯度均在 90% 以上, 满足 ELISA 检测包被用原料纯度的要求。

以上述 4 种蛋白作为包被原料, 分别进行抗原包被板的制备, 以 10 份企业阳性质控品血清和 10 份企业阴性质控品血清为检验指标比较不同抗原对猪瘟病毒抗体 ELISA 检测效果的影响。结果采用 E2 蛋白作为原料进行包被时, 检测灵敏度和特异性均达到 80% 以上, 能够满足猪瘟病毒抗体 ELISA 检测的要求; 采用 E0 蛋白作为原料进行包

被时, 检测结果随机性很大, 数据无规律; 采用 C 蛋白作为原料进行包被时, 检测结果存在很严重的非特异性结合; 采用 NS5B 蛋白作为原料进行包被时, 检测结果基本为阴性, 说明该蛋白的捕获能力很弱, 不能满足猪瘟病毒抗体 ELISA 检测的要求。故采用 E2 蛋白作为包被原料并进行猪瘟病毒抗体检测试剂的初步研制。

利用酶联免疫间接法原理, 初步研制出猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂, 并将其与国际知名度高、产品质量好的美国 IDEXX 同类试剂对 432 份临床猪血清进行符合性检测, 结果与美国 IDEXX 试剂的阳性符合率为 95.53%, 阴性符合率为 86.56%, 总符合率为 91.67%, 符合性检测数据显示两种试剂检测结果具有较高的一致性。同时, 两种试剂盒还存在有 10% 左右的差异, 出现这种差异的可能原因有以下两点: 1) 两种试剂组分及检验原理上的差异, 美国 IDEXX 试剂是采用酶联免疫阻断法的原理, 涉及到酶标记单克隆抗体, 中道试剂是采用酶联免疫间接法的原理, 涉及到物种 IgG 的酶标二抗, 因酶标记物的不同, 间接法酶标的二抗相对于阻断法而言, 将样本检测出为阳性结果的概率要稍大一些。2) 由于各地猪瘟病毒 E2 蛋白的基因序列略有不同, 猪瘟病毒可以划分为 3 个基因群, 同时每群又划分为一些亚群。据相关文献报道^[12], 中国的猪瘟病毒主要是在第 2.1 亚群, 英美国家的猪瘟病毒主要是在第 1.1 亚群。所以同属猪瘟病毒的 E2 蛋白, 我国的 E2 蛋白和美国的 E2 蛋白在一些基因序列上也会存在些许的差异, 从而以它们为原

料进行产品生产后会导致产品间检测结果存在一些差异。综上所述,用 E2 蛋白为包被抗原对猪瘟病毒抗体进行 ELISA 检测的效果最好,制备的检测试剂可初步用于临床猪瘟病毒血清抗体的检测,为今后猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂的进一步研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 卫选智, 张付华, 王新平, 等. 不同免疫程序对猪瘟活疫苗免疫效果的研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 7-12.
Wei X Z, Zhang F H, Wang X P, *et al.* Research about different immunization procedures on the immune effect of CSFV live vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(2): 7-12.
- [2] 李明义, 白志娟, 王莉娟, 等. 猪瘟灭活疫苗抗体消长规律动态研究[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(5): 385-388.
Li M Y, Bai Z J, Wang L J, *et al.* Dynamic study on the eating and flowing laws of CSF antibody induced by CSF inactivated vaccine[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005, 27(5): 385-388.
- [3] Vandeputte J, Too H L, Ng F K, *et al.* Adsorption of colostral antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs[J]. American Journal of Veterinary Research, 2001, 62(11): 1805-1811.
- [4] 韩雪清, 刘湘涛, 赵启祖. 猪瘟病毒及其猪瘟疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2000, 2(21): 1-7.
Han X Q, Liu X T, Zhao Q Z. Progress of study on swine fever virus and its vaccine[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2000, 2(21): 1-7.
- [5] Tesmer S, Urbaneck D, Kaden V, *et al.* Effect of attenuated hog cholera virus vaccine from the inoculation virus strain "c" on pregnant sows and the progeny[J]. Monatshefte Für Veterinärmedizin, 1973, 28(7): 251-254.
- [6] Robertson A, Greig A S, Appel M, *et al.* Hog cholera IV. Detection of the virus in tissue culture preparations by the fluorescent antibody technique[J]. Canadian Journal of Comparative Medicine & Veterinary Science, 1965, 29(9): 234-241.
- [7] Moser C, Ruggli N, Tratschin J D, *et al.* Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 [J]. Veterinary Microbiology, 1996, 51(1): 41-53.
- [8] [美] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 625-632.
[U.S.A] Written by J Sambrook, D W Russell. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. Translated by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002: 625-632.
- [9] 李学伍. 猪病快速诊断与防治技术[M]. 北京: 机械工业出版社, 2014: 44.
Li X W. Technology of Rapid Diagnosis and Preventive Treatment for Swine Disease [M]. Beijing: China Machine Press, 2014: 44.
- [10] Voller A, Bartlett A, Bidwell D E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques [J]. Journal of Clinical Pathology, 1978, 31(6): 507-520.
- [11] McLaren M L, Lillywhite J E, Au A C. Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Practical aspects of standardization and quality control[J]. Medical Laboratory Sciences, 1981, 38(3): 245-251.
- [12] 陈继明. 重大动物疫病监测指南[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 190-191.
Chen J M. Manual for the monitoring of major animal diseases [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 190-191.

(编辑:李文平)