

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.01

狂犬病毒 G 蛋白原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

张莹辉,朱真,杜吉革,薛麒,陈小云,冯宇,印春生*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-01-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2022)04-0001-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 目前狂犬病疫苗的效力检验采用 NIH 法,需要使用狂犬病毒 CVS-24 毒株进行攻毒试验,具有一定的生物安全风险。为寻求替代 NIH 法中脑内攻毒试验的方法,研究扩增狂犬病毒 G 蛋白基因,并将其克隆至大肠杆菌 pET-32a 载体上进行表达,以该蛋白作包被抗原,摸索试验条件,建立了检测小鼠血清抗体效价的间接 ELISA 方法。使用此方法与国际公认的荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 法比较,两者检测结果曲线相关系数为 0.986,表明相关性较好,但 ELSIA 方法更加快捷、简便。本试验建立的间接 ELISA 方法可用于检测小鼠血清中狂犬病抗体,为狂犬病毒血清抗体测定和单克隆抗体筛选提供依据。

[关键词] 狂犬病;G 蛋白;原核表达;ELISA 方法

Prokaryotic Expression of Rabies G Protein and the Establishment of Indirect ELISA Method

ZHANG Ying-hui, ZHU Zhen, DU Ji-ge, XUE Qi, CHEN Xiao-yun, FENG Yu, YIN Chun-sheng*

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

Corresponding author: YIN Chun-sheng, E-mail: zjs62158844@sohu.com

Abstract: The effectiveness of rabies vaccines is tested using the NIH method, which requires the use of CVS-24 for challenge tests, which poses a certain biological safety risk. To establish an indirect ELISA method for detecting antibody titers in mouse serum to replace the brain challenge test in the NIH method. The G protein gene of the rabies virus (RV) is amplified and cloned into the *E. coli* pET-32a vector for expression. Indirect ELISA method for detecting antibody titer in mouse serum has been established with the expressed G protein. Compared with the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN), which is internationally recognized, the correlation coefficient of the two methods is 0.986, demonstrated that these two methods have highly consistency.

基金项目:十三五国家重点研发计划项目(2016YFD0501004)

作者简介:张莹辉,硕士,从事人畜共患病及兽用生物制品研究。

通讯作者:印春生。E-mail:zjs62158844@sohu.com

Comparatively, the ELISA is simpler and more efficient. The indirect ELISA method established in this experiment can be used to detect rabies antibodies in mouse serum, providing a basis for the establishment of an alternative method for testing the efficacy of rabies vaccines.

Key words: rabies; G protein; prokaryotic expression; ELISA method

狂犬病是由狂犬病毒(Rabies virus, RV)引起的侵犯中枢神经系统的人畜共患传染病,发病后致死率几乎为 100%^[1]。RV 入侵宿主后能够在宿主体内大量复制,进而转移至中枢神经系统而使其发病,狂犬病常见的临床症状包括神经兴奋、意识障碍等,最终全身麻痹死亡^[2]。我国是受狂犬病危害较为严重的国家,其发病率仅次于印度,年均有 2000~3000 人因狂犬病死亡。该病在我国法定上报的传染病中位列前三^[3]。

RV 属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)狂犬病毒属(Lyssavirus),是一种具有包膜的单链负股 RNA 病毒。它具有 5 种主要的结构蛋白,分别是核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、包膜糖蛋白(G)和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(L)。其中 G 蛋白位于病毒的囊膜外,是目前发现唯一可以刺激机体产生中和抗体的蛋白抗原^[4-5]。通过基因重组表达的 G 蛋白可用于制备狂犬病亚单位疫苗,这在许多国家都已经有所应用。除此之外,G 蛋白作为抗原还可以用于 RV 血清抗体的检测。

本研究拟采用 pET-32a 作为表达载体,使用大肠杆菌表达系统,对 G 蛋白进行优化表达,并对表达出的 G 蛋白进行纯化、鉴定,建立以 G 蛋白为抗原的间接 ELISA 方法,以期为 RV 血清抗体测定和单克隆抗体筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料 RV CVS-11 株由中国兽医药品监察所提供;pET-32a 原核表达载体、Vero 细胞均为本试验室保存;pMD-18T 平末端载体、大肠杆菌 JM109 感受态细胞、DH5 α 感受态细胞和 Rosetta (DE3)感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂 Premix Ex Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;Xho I 和 EcoR I DNA 限制性内切酶、

T₄ DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;病毒 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司;抗 His 标签单克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠二抗均购自美国 Sigma 公司;HRP 标记的兔抗小鼠 IgG、HRP 标记的羊抗犬 IgG 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;IPTG、氨苄、卡那霉素购自天根生物有限公司。

1.3 目的基因的克隆

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 中所提供 RV 的 G 蛋白基因序列(NCBI 号:NC_001542.1),使用 Primer5 软件设计上下游引物各一条,其中上游引物 G-F/EcoR I 序列为 CG GAATTC ATGTT-CCTCAGGTTCTTT,下游引物 G-R/Xho I 序列为 CC CTCGAG TCACAGTCTGGTCTCGCC,其中斜体部分为保护碱基,下划线部分为酶切位点,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.3.2 总 RNA 提取及目的基因片段扩增 使用 OMEGA 病毒 RNA 提取试剂盒对 RV 细胞液进行总 RNA 提取,使用反转录试剂盒利用下游引物 G-R/Xho I 获得 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增目的片段:cDNA 1 μ L、上下游引物各 1 μ L、Premix Ex Taq 酶 25 μ L、双蒸水 22 μ L,混匀后 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,32 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,扩增后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定目的条带并进行胶回收。

1.3.3 目的基因测序鉴定 将胶回收后的目的片段连接到 pMD-18T 平末端载体上,得到 pMD-18T-G 并将其转化至 JM109 感受态细胞中,挑取菌落进行 PCR 鉴定,将鉴定连接成功的阳性克隆菌进行测序并扩增(测序由中美泰和生物技术公司完成)。

1.4 G 蛋白的表达及纯化

1.4.1 表达载体的构建 将测序成功的目的基因用 *Xho* I 和 *Eco*R I DNA 限制性内切酶酶切后,使用 T_4 DNA 连接酶与同样进行双酶切的 pET-32a 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 中,转化后使用含有氨苄西林的选择性 LB 琼脂培养基 37 °C 过夜进行培养,挑取单菌落进行扩大培养并进行菌液 PCR 鉴定,对鉴定成功的菌液进行质粒提取,送至中美泰和生物技术公司测序。将测序正确的质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中,经菌液 PCR 鉴定成功后将该质粒命名为 pET-32a-RVG。将表达菌扩大培养后冻存于 -80 °C 备用。

1.4.2 G 蛋白的表达 将活化后的表达菌接种到 10 mL 含有 Amp 抗性的 LB 肉汤培养基中,37 °C 200 r/min 摇菌过夜,第 2 天以 1% 的比例接种于 50 mL 含有 Amp 抗性 LB 肉汤培养基中,37 °C 200 r/min,4 h 后每隔 30 min 取 100 μ L 菌液进行 OD_{600nm} 测定,直到 OD_{600nm} 值达到 0.5~0.6,停止摇菌。取出 1 mL 菌液作为未诱导对照,再加入终浓度为 1.0 mmol/L 的诱导剂 IPTG,在合适的诱导温度下继续培养,诱导结束后收集菌液,将未诱导和诱导后菌液均离心后弃去上清培养基,加入无菌 PBS 重悬沉淀,进行超声波裂解,直至溶液清亮,10000 r/min 离心 5 min,分别收集裂解后的沉淀和上清进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.4.3 G 蛋白的纯化及鉴定 将鉴定正确的包涵体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,对所需的条带进行切胶回收,具体操作是将电泳后的蛋白胶浸泡在 0.25 mmol/L 的 KCl 溶液中约 5 min,同时将蛋白 Marker 泳道和相邻蛋白样品泳道切下染色,观察胶块中的蛋白条带,并与 Marker 对照,将所需目的蛋白条带切下,用 PBS 清洗 2 次,将胶块在洁净密封袋中碾碎,加入一定量的 PBS 溶液,置于 4 °C 冰箱中过夜,12000 r/min 离心 10 min,得到纯化后的 G 蛋白。对纯化后的蛋白使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度定量测定,并使用 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 进行鉴定。

1.5 间接 ELISA 检测方法的建立

1.5.1 抗血清的制备 使用狂犬病国际标准疫苗以每次每只 200 ng 的量免疫 10 只 Balb/c 小鼠,共免疫 3 次。初次免疫使用弗氏完全佐剂对疫苗进行乳化,以后每隔 2 周加强免疫一次,加强免疫时使用弗氏不完全佐剂对疫苗进行乳化。从首次免疫后第一周开始,每两周收集一次小鼠血液,共收集 5 次,分离并混合血清,此血清作为阳性标准血清。同时取空白的 Balb/c 小鼠血清作为阴性标准血清。

1.5.2 间接 ELISA 方法建立 将纯化后的 G 蛋白作为抗原以不同的浓度包被于固相载体上,封闭后使用 1.5.1 中得到的阳性标准血清和阴性标准血清作为一抗与包被抗原结合,洗板去除未结合物,再加入 HRP 标记的羊抗鼠酶标抗体,最后通过加入能与酶反应的底物显色,通过读取 OD_{450nm} 值进行定量判断。

1.5.2.1 抗原最佳包被量及一抗最佳稀释比例的确定 使用交叉实验的方法:将纯化后的 G 蛋白抗原按照 1 μ g、500 ng、250 ng、125 ng、62.5 ng、31.25 ng、15.625 ng、7.8125 ng 每孔的量包被到酶标板中,每孔 100 μ L;将阳性血清、阴性血清分别进行 1:50、1:100、1:200、1:400 倍稀释,每孔 100 μ L。操作步骤按照常规间接 ELISA 方法进行。

1.5.2.2 酶标二抗稀释度优化 将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 酶标抗体用 PBS 进行 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 倍稀释。按照常规 ELISA 方法进行,根据试验结果确定酶标抗体的最佳使用浓度。

1.5.2.3 底物显色时间优化 使用 TMB 底物在室温下避光显色 5、10、15 和 20 min。按照常规 ELISA 方法进行,根据试验结果确定显色时间。

1.5.2.4 封闭条件优化 分别使用 1% 脱脂乳、5% 脱脂乳、1% BSA、5% BSA 进行包被抗原的封闭,同时设置 4 °C 封闭过夜、37 °C 封闭 2 h 的封闭条件,按照常规 ELISA 方法进行,根据结果确定试验最佳封闭条件。

1.5.3 间接 ELISA 方法阴阳性临界值、敏感性和特异性鉴定以及标准曲线的确定

1.5.3.1 阴性临界值的确定 使用此方法检测 30 份空白小鼠血清,计算血清 OD_{450nm} 值的平均值和标准方差,并根据公式(阴性临界值 = 平均值 + 3 × 标准方差)计算阴阳临界值。

1.5.3.2 敏感性试验 按照 1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 倍倍比稀释狂犬病病毒阳性血清,依次加入到包被好 G 蛋白抗原的 ELISA 板中,根据阴阳性临界值确定能够检测为阳性结果的稀释度,来确定方法的敏感性。

1.5.3.3 特异性试验 按照建立的间接 ELISA 方法,将狂犬病阴性血清和 3 份未免疫狂犬病疫苗小鼠的细小病毒阳性血清、3 份犬瘟热病毒阳性血清进行检测,重复 3 次,根据待检血清和阴阳血清 OD_{450nm} 值确定试验的特异性。

1.5.3.4 标准曲线的确定 使用 FAVN 法和犬的标准阳性血清对 ELISA 方法中小鼠标准阳性血清的效价进行测定,然后对小鼠标准阳性血清进行梯度稀释,测定其对应的 OD_{450nm} 值,以 OD_{450nm} 值为 x 轴、稀释度对应的阳性血清效价为 y 轴,绘制出表示两者线性关系的标准曲线。

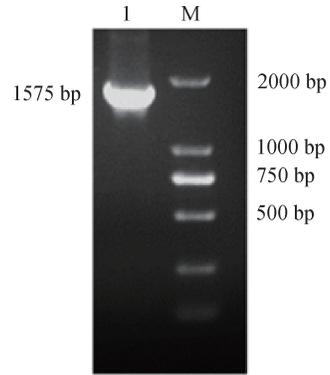
1.5.4 方法与荧光抗体病毒中和试验(FAVN)法对比 使用已经建立的 ELISA 方法和 FAVN 方法分别对 10 份小鼠狂犬病阳性血清进行检测,分别计算出 10 份血清效价,比较两种方法的相关性。

2 结果与分析

2.1 G 蛋白基因的扩增 以 CVS-11 株 RV 的 cDNA 为模版,用上下游引物进行扩增,扩增出 G 蛋白全长基因片段,大小为 1575 bp(图 1),符合预期大小。

2.2 G 蛋白基因的克隆及鉴定 重组质粒 pMD18-T-G 经 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定,得到 1575 bp 和 2962 bp 大小的两个片段(图 2),证明 G 蛋白基因已经正确克隆到 T 载体上。

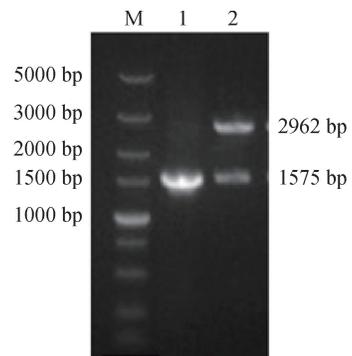
2.3 重组表达质粒 pET-32a-G 的构建及鉴定 用 *Xho*I 和 *Eco*R I 对目的片段进行双酶切后连接于酶切后的 pET-32a 载体上,对质粒进行双酶



1: PCR product of G gene; M: DL2000 DNA Marker

图 1 G 蛋白基因 PCR 扩增结果

Fig 1 Amplification of G gene with PCR



M: DL5000 DNA Marker; 1: PCR product of G gene;

2: Double enzyme digestion product of pMD18-T-G

图 2 pMD18-T-G 双酶切鉴定结果

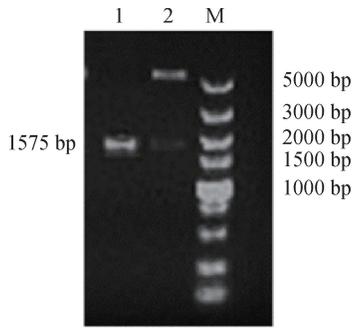
Fig 2 Double enzyme digestion of pMD18-T-G

切鉴定,得到 1575 bp 和 5900 bp 大小的两个片段(图 3),鉴定正确后送测序,测序结果正确。pET-32a-G 构建成功。

2.4 重组表达蛋白 SDS-PAGE 鉴定及其可溶性分析 重组菌经诱导表达后,在 62 kD 附近出现目的条带(图 4),且多存在于包涵体沉淀中,表明蛋白以包涵体形式存在。

2.5 重组表达蛋白的纯化及其鉴定 对切胶纯化后的 G 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 鉴定,结果显示纯化后的蛋白无杂蛋白,纯度较高(图 5、图 6)。

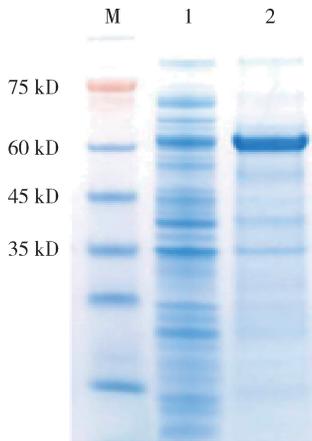
2.6 间接 ELISA 最佳工作条件的确定 根据正交实验结果,当 G 蛋白抗原包被量为 7.8125 ng/孔、



M: DL5000 DNA Marker; 1: PCR product of G gene;
2: Double enzyme digestion product of pET-32a-G

图 3 pET-32a-G 双酶切鉴定结果

Fig 3 Double enzyme digestion of pET-32a-G

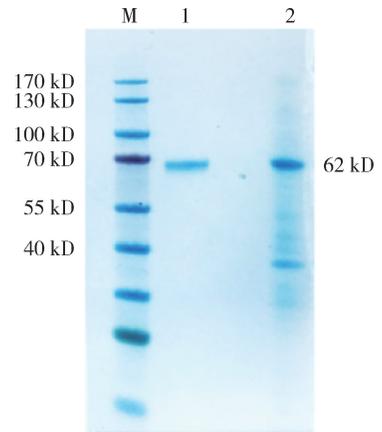


M: Protein Marker; 1: Supernatant of pET-32a-G;
2: Inclusion bodies of pET-32a-G

图 4 重组表达蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

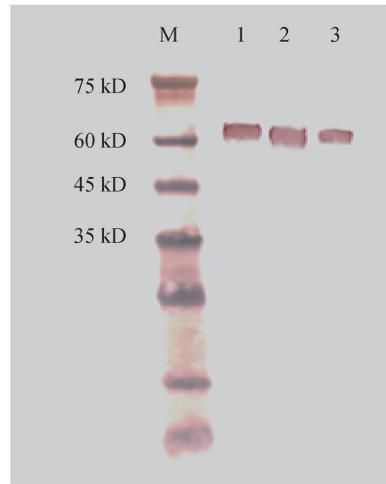
血清稀释度为 1:100 时,阳性血清接近 1.0,此时阳、阴性血清 OD_{450nm} 比值(P/N)最大。因此选择 1:100 为最佳的阴阳性血清稀释度,7.8125 ng/孔为最佳的抗原包被量。使用 4 种封闭液分别封闭抗原,间接 ELISA 方法测定封闭效果,使用 5% BSA 作为封闭液时,阳性血清 OD_{450nm} 值在 1 附近,且阳性、阴性血清 OD_{450nm} 比值最高,故 5% BSA 为最佳封闭液。将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体进行 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 倍稀释,按照间接 ELISA 方法测定阴阳性血清的 OD_{450nm} 以及 P/N 值,酶标二抗的最佳稀释浓度为 1:8000。使用 TMB 底物显色液在避光条件下进行 ELISA 试验,分别在在



M: Protein Marker; 1: Purified protein; 2: Inclusion bodies

图 5 G 蛋白纯化前、后的 SDS-PAGE 分析

Fig 5 SDS-PAGE of purified G protein



M: Protein Marker; 1-3: purified protein

图 6 纯化后 G 蛋白的 Western Blot 分析

Fig 6 Western Blot result of purified G protein

同时终止显色,测定阴阳性血清 OD_{450nm} 值,确定底物显色时间为室温下避光 15 min。对已知的 30 份狂犬病病毒抗体阴性血清进行检测,计算 OD_{450nm} 平均值为 0.1648,标准差为 0.0313,因此阴阳性临界值为 0.2587。

2.7 ELISA 方法敏感性试验 使用本试验建立的 ELISA 方法对不同稀释倍数的阳性血清样品进行敏感性检测。如表 1 所示,当血清在 1:16000 倍稀释时,其 OD_{450nm} 大于阴阳性临界值,且 P/N 值大于 2。

表 1 间接 ELISA 检测方法敏感性分析

Tab 1 Sensitivity analysis of the ELISA assay

血清稀释倍数	4000	8000	16000	32000	阴性血清
OD _{450nm}	0.8270	0.5602	0.3834	0.2226	0.1591

2.8 ELISA 方法特异性试验 用间接 ELISA 方法检测犬细小病毒小鼠阳性血清和犬瘟热病毒小鼠阳性血清,同时设置狂犬病病毒阳性血清、阴性血清和空白对照,试验结果如表 2 所示,犬细小、犬瘟热病毒以及空白小鼠血清 OD_{450nm} 平均值均在阴阳性临界值之下,说明 ELISA 方法特异性较好。

表 2 间接 ELISA 方法的特异性分析

Tab 2 Specificity of the ELISA assay

血清	OD _{450nm} 平均值	交叉反应
犬细小病毒血清	0.1023	无
犬瘟热病毒血清	0.0920	无
空白对照	0.0417	/
阳性血清	1.1960	/
阴性血清	0.1591	/

2.9 ELISA 方法标准曲线方程 使用 ELISA 方法以及已知效价的小鼠狂犬病阳性血清进行试验,如表 3 所示,以 ELISA 方法检测的血清中和抗体 OD_{450nm} 值作为 x 轴,以已知的中和抗体滴度作为 y 轴,建立计算抗体滴度的标准曲线方程(图 7),得出多项式方程 $y = 0.839x^2 - 1.1798x + 0.51$,其相关系数为 0.98,接近 1,表明两者的相关性较好。

表 3 不同中和抗体滴度对应的 OD_{450nm} 值

Tab 3 Absorbance values corresponding to different neutralizing antibody titers

OD _{450nm}	2.2384	1.8714	1.4186	1.0299	0.7413	0.4917
中和抗体滴度/ (IU · mL ⁻¹)	2.16	1.08	0.54	0.27	0.135	0.0675

2.10 ELISA 与 FAVN 试验结果比较 本试验中狂犬病病毒感染 Vero 细胞荧光照片如图 8。当孔内出现类似如图所示的细胞内荧光显影时,即可将该孔判定为阳性,未出现细胞内荧光显影,可判定为阴性,如图 9。

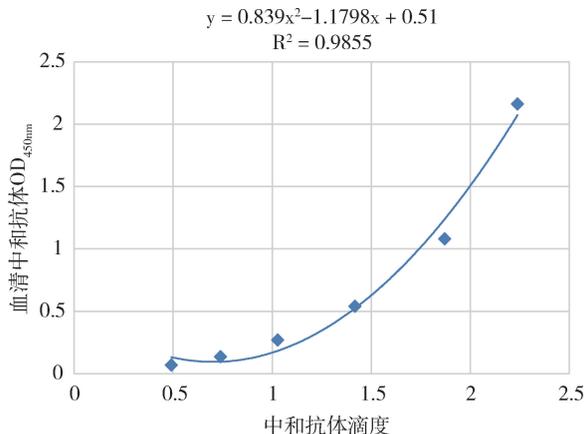


图 7 不同中和抗体滴度对应的 OD_{450nm} 值标准曲线

Fig 7 Standard curve of OD_{450nm} value corresponding to different neutralizing antibody titers

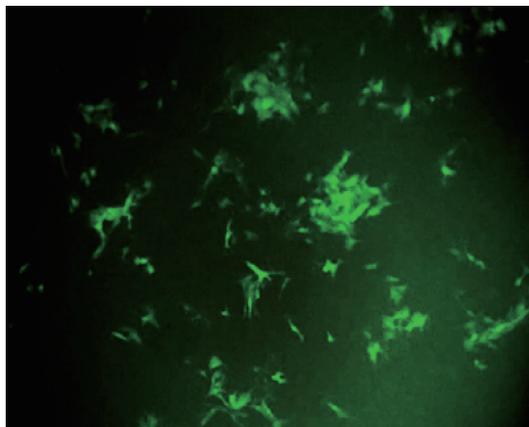


图 8 CVS-11 感染 Vero 细胞荧光图

Fig 8 Fluorescence picture of CVS-11 infected Vero cells

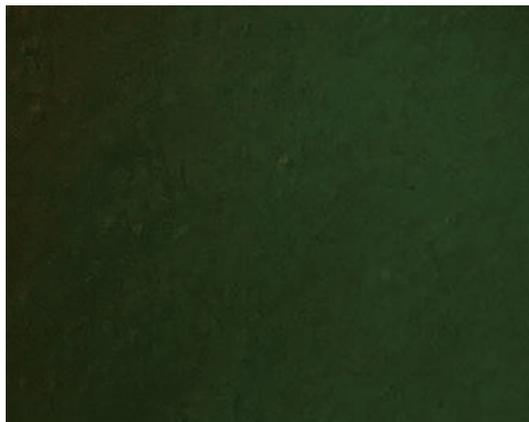


图 9 未被病毒感染 Vero 细胞荧光图

Fig 9 Fluorescence picture of Vero cells without virus infection

使用 ELISA 和 FAVN 方法检测 10 份阳性血清样品,分别计算其抗体含量,如表 4 所示,将两者的结果变化趋势以折线图表示(图 10),计算两条折线的相关系数为 0.986。两种方法检测 10 份血清的阳性率均为 100%,表明本试验建立的 ELISA 方法与 OIE 推荐的 FAVN 法检测小鼠血清抗体效价具有较非常高的符合率。

表 4 FAVN 法和 ELISA 检测 10 份血清样品的抗体含量

Tab 4 Result of antibody content use
FAVN and ELISA method

血清编号	抗体含量/(IU · mL ⁻¹)	
	FAVN 法	ELISA 法
1	15.6	9.126
2	17.1	9.212
3	23.3	12.801
4	6.6	3.117
5	7.7	5.430
6	7.0	4.303
7	11.8	7.277
8	21.4	11.926
9	4.7	4.126
10	15.4	9.011

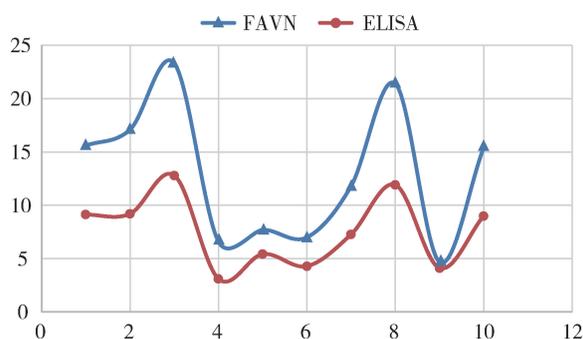


图 10 ELISA 和 FAVN 法检测 10 份血清样品中和抗体含量结果比较

Fig 10 Comparison of the results of ELISA and FAVN method for detecting the content of neutralizing antibody in 10 serum samples

3 讨论

狂犬病严重危害着人类和动物的健康,我国是受其影响最严重的国家之一。目前针对人类的狂

犬病,预防性接种和暴露后的接种是防治狂犬病的主要措施。狂犬病疫苗的使用效果需要通过免疫后的抗体效价监测来实现,目前 WHO 推荐的抗体监测方法为 FAVN 法,这种方法在试验过程中需要使用 CVS-24 毒株,存在一定的危险性^[6]。而 ELISA 方法具有灵敏度高、快速、操作便捷、成本低的优点,除使用全病毒粒子之外,使用具有特异性抗体识别位点的 G 蛋白进行抗体的检测也具有一定的可行性^[7]。RV 中 G 蛋白的基因全长为 1575 bp,由 524 个氨基酸组成,G 蛋白与病毒的致病力有密切的关系,并且能够诱导细胞免疫,刺激机体产生对抗病毒的中和抗体。G 蛋白是一种跨膜蛋白,具有三聚体结构,位于狂犬病病毒包膜和感染细胞的质膜中,包含胞质内区域,疏水性跨膜区域和胞外区域,三种单体的结合形成了三聚体^[8]。研究表明 G 蛋白具有 3 个中和抗体结合位点,其中 III 号位点最为重要,是位于 330~357 位氨基酸序列,G 蛋白变性后,III 号位点随即消失,但除此之外,G 蛋白还含有一些线性表位,这些表位不依赖于高级空间结构也能够存在,在变性的蛋白中能够存在,从而能够被抗体特异性识别。

本研究以原核系统表达的 G 蛋白作为包被原,使用免疫了狂犬病标准疫苗的小鼠血清作为阳性血清,以辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体作为二抗,摸索各个试验环节的最佳条件,最终建立了间接 ELISA 方法,可以用于检测小鼠血清样品中狂犬病病毒中和抗体的水平,也可以用于狂犬病病毒 G 蛋白单克隆抗体制备过程中,抗狂犬病病毒 G 蛋白抗体阳性杂交瘤细胞的筛选。本方法的特异性好,与常见的能够感染犬只的犬细小病毒和犬瘟热病毒均无交叉反应;本方法的敏感性高,在血清稀释度为 1:16000 时仍然能够检测出阳性,这也说明虽然试验使用的包被抗原以包涵体形式存在,但其主要的抗原抗体结合位点并未受到空间构象的影响。

FAVN 法具有很好的灵敏度和准确性,其结果在判定时较荧光灶试验受主观因素影响小,且试验周期较短,是广泛使用的抗体效价检测方法,也是

国际公认的检测狂犬病病毒中和抗体的金方法之一^[9-10]。使用荧光抗体病毒中和试验与本试验建立的 ELISA 方法同时检测 10 份小鼠血清,结果表明两种检测方法得出的结果相关性较好,阳性符合率为 100%。进一步说明本试验建立的 ELISA 检测方法结果可靠。ELISA 方法具有简便、快速、灵敏度高优点,且对试验条件的要求低,相比于 FAVN 法,具有不用活毒、试验周期短、可检测样本量大等优点。因此 ELISA 方法更适用于疫苗效力检验中免疫小鼠血清中和抗体的测定。

本试验中使用 G 蛋白作为包被原建立的 ELISA 方法可用于检测小鼠血清抗体含量,也可用于狂犬病病毒 G 蛋白单克隆抗体制备过程中的阳性杂交瘤细胞筛选,当把本 ELISA 方法中辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体换作抗犬的抗体之后,经过优化试验条件,也可用于犬血清中狂犬病病毒中和抗体的检测,对疫苗免疫后的犬体内抗体含量变化情况进行监测,来评价疫苗的免疫效果^[11]。

参考文献:

[1] Warrell M J, Warrell D A. Rabies and other lyssavirus diseases [J]. *Lancet*, 2004, 363(9424): 959.

[2] Dsvis B M, Rall G F, Schnell M J. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask) [J]. *Annual Review of Virology*, 2015, 2(1): 451.

[3] 姜楠. 狂犬病的综合防控 [J]. *农民致富之友*, 2018, (1): 94.

Jiang N. Comprehensive prevention and control of rabies [J]. *Friends Who Make Farmers Getting Rich*, 2018, (1): 94.

[4] 郑光来, 卢晓冉, 张静远, 等. 狂犬病病毒 M 蛋白在杆状病毒中的表达、纯化及多克隆抗体的制备 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(04): 472-477.

Zhang G L, Lu X R, Zhang J Y, *et al.* Expression and purification of M protein of RV in Baculovirus and preparation of its polyclonal antibody [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(04): 472-477.

[5] 王岩, 邓红雨, 王新卫. 狂犬病病毒糖蛋白功能的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011, 21: 30-32.

Wang Y, Deng H Y, Wang X W. Research progress on the function of rabies virus glycoprotein [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011, 21: 30-32.

[6] 傅秋玲, 郑佳琳, 林颖仪, 等. 检测犬源狂犬病病毒中和抗体 ELISA 方法的建立 [J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(4): 561-565.

Fu Q L, Zheng J L, Lin Y Y, *et al.* Development of an ELISA for detection of neutralizing antibodies against canine rabies virus [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33(4): 561-565.

[7] 张静远. 基于 RABV 糖蛋白膜外区的阻断 ELISA 抗体检测方法建立及应用 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.

Zhang J Y. Development and application of a blocking ELISA for RABV antibody detection using the glycoprotein ectodomain as coating antigen [D]. *Academy of Military Medical Sciences*, 2017.

[8] Astray R M, Augusto E, Yokomizo A Y, *et al.* Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells [J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 3(1): 98-103.

[9] Smith J S, Yager P A, Baer G M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus - neutralizing antibody [M]. 4th Ed. Geneva: World Health Organization, 1996: 181-191.

[10] 张守峰, 张菲, 刘晔, 等. FAVN 与 RFFIT 在动物和人狂犬病中和抗体检测中的比较 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015(09): 1161-1163.

Zhang S F, Zhang F, Liu Y, *et al.* Comparison between FAVN and RIFIT for rabies neutralizing antibody detection of sera from animals and human [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2015(09): 1161-1163.

[11] 张莹辉. 小鼠间接 ELISA 抗体评价兽用狂犬病灭活疫苗效力的研究 [D]. 中国农业大学, 2020.

Zhang Y H. Research on the efficacy evaluation of veterinary rabies inactivated vaccine based on antibody detection in mice using indirect ELISA [D]. *China Agricultural University*, 2020.

(编辑:李文平)