

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.03

猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白 间接 ELISA 方法的建立

陈汉锬^{1,2}, 林旭堃^{1,2*}, 田允波¹, 齐冬梅², 邹伟斌², 胡美容²

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广州 510225; 2. 广东永顺生物制药股份有限公司, 广州 511356)

[收稿日期] 2018-12-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0017-10 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研制特异性敏感性较好的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 抗体检测方法, 更好地实现 PRRSV 的流行病学监测和诊断, 将 PRRSV GDr180 毒株 N 蛋白基因序列克隆到 pET32a(+) 载体中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞内实现了高效表达, 表达形式为可溶性表达, 通过 Western blot 证明表达产物与 PRRSV GDr180 株阳性血清具有很好的反应原性和特异性。将大肠杆菌表达的 N 蛋白经过超声、离心、过柱纯化后, 作为间接 ELISA 包被抗原检测血清中的 PRRSV 抗体, 通过对各参数和试剂的优化建立了能检测 PRRSV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法; 对方法的特异性和重复性以及同类成品试剂盒间的应用效果对比进行了试验。结果表明, 研究建立的 ELISA 抗体检测方法可用于检测猪血清中 PRRSV 抗体、监测猪繁殖与呼吸综合征的流行情况和评价相关疫苗的免疫效果。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征; PRRSV; ELISA

Establishment of ELISA Method for Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibodies

CHEN Han-si^{1,2}, LIN Xu-ye^{1,2*}, TIAN Yun-bo¹, QI Dong-mei², ZOU Wei-bin², HU Mei-rong²

(1. College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Guangdong Winsun Bio-Pharmaceutical Co., LTD., Guangzhou 511356, China)

Corresponding author: LIN Xu-ye, E-mail: linxuye@126.com

Abstract: In order to develop a specific and sensitive porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibody detection method, to better realize the epidemiological monitoring and diagnosis of PRRSV, the N-protein gene sequence of PRRSV GDr180 strain was cloned into pET32a(+) vector, and it was highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells in the form of soluble expression. Western blotting showed that the expression product had good reactivity and specificity with the positive serum of PRRSV GDr180 strain. The N protein expressed by *E. coli* was purified by ultrasound, centrifugation and column chromatography, and used as a

基金项目: 猪重要疫病的诊断与检测新技术研究 (2016YFD0500600)

作者简介: 陈汉锬, 硕士, 从事兽用生物制品方面研究。

通讯作者: 林旭堃。E-mail: linxuye@126.com

coating antigen of indirect ELISA to detect the PRRSV antibody in the serum. By optimizing the parameters and reagents, an indirect ELISA method for detecting PRRSV serum antibody was established. The specificity and repeatability of the method and the comparison with the application effects of the similar finished kits were tested. The results showed that the ELISA antibody detection method established in this study can be used to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in pig serum, monitor the prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome and evaluate the immune effect of related vaccines.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRSV; ELISA

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是单股正链不分节段的 RNA 病毒, 属于动脉炎病毒科、动脉炎病毒属; 即是作为全球猪业疾病的猪繁殖和呼吸综合征 (PRRS) 的病原^[1]。PRRSV 于 1987 年在美国爆发随后相继在其他国家蔓延^[2-3]; 2006 年, PRRSV 在中国爆发。PRRSV 目前分为欧洲型 (基因 I 型) 和美洲型 (基因 II 型) 两个血清型, 中国主要流行的是美洲型 PRRSV (NA-PRRSV)^[4-5]。PRRSV 基因组全长 15 kb 左右, 至少由 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3 ~ ORF7 等 9 个开放阅读框 (ORF) 组成, 其中 ORF7 编码 GP7 蛋白 (又名 N 蛋白)^[6-8]。N 蛋白含量较高, 占 PRRSV 病毒蛋白达 20% ~ 40%^[9]; N 蛋白具有较强的免疫原性, 在感染后的早期阶段就可刺激机体产生持续期比较长的特异性抗体, 这对 PRRSV 的早期诊断具有重要意义^[10-12]。

ELISA 方法具有成本低、安全、特异性和灵敏度较高、方便在基层推广应用的优点, 临床检测 PRRSV 抗体一般都是采用 ELISA 方法^[13]。目前国内普遍采用国外的 ELISA 试剂盒进行 PRRSV 抗体的检测, 但价格昂贵, 大大提高了 PRRSV 的流行病学监测和诊断成本, 不利于推广。本试验以表达纯化的 PRRSV-N 蛋白为包被抗原, 优化 ELISA 检测方法的各种条件建立了检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 检测方法, 通过进一步优化工艺, 期望能开发出特异性、敏感性、稳定性均较好的猪呼吸与繁殖综合征抗体检测间接 ELISA 试剂盒, 降低 PRRSV 的监测和诊断成本。

1 材料

PRRSV-GDr180、伪狂犬病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪肺炎支原体 (MHP)、口蹄疫病毒 (FMD)、猪细小病毒 (PPV)、猪乙型脑炎病毒 (JEV)、猪圆环病毒 2 型病毒 (PCV2) 标准阳性血清, PRRSV-GDr180 标准阴性血清, 由广东永顺生物制药股份有限公司中心实验室提供; HRP 酶标羊抗猪二抗购自 abcam 公司; 酶标板购自广州洁特生物过滤股份有限公司; 显色底物购自康为世纪生物科技有限公司。

2 方法

2.1 重组蛋白基因质粒的构建

2.1.1 N 基因片段的 pcr 扩增 从 GenBank 上下下载 PRRSV GD 株 (GenBank 登录号: EU825724) 的基因组序列, 设计一对引物并加上 *Bam*H I 限制性酶切位点和 *Hind* III 限制性酶切位点, 送上海生工合成引物后, 以 PRRSV 病毒 CDNA 为模板进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳观察目的片段并回收保存。

2.1.2 pET32a-PRRSV-N 重组载体的构建与鉴定 利用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别对 pET32a(+) 载体和回收的 N 基因片段进行双酶切, 将酶切回收产物 pET32a(+) 载体和 N 基因片段用 T4 连接酶连接后转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 然后将细胞涂在氨苄霉素抗性的 LA 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 从平板上挑取单菌落并过夜培养, 提取质粒进行双酶切鉴定, 再把 pET32a-PRRSV-N 重组质粒转进 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 然后按同上的方式培养以及鉴定, 并将阳性重组质粒送往上海生工生物技术有限公司进行测序。

2.2 重组蛋白的表达及纯化

2.2.1 重组 N 蛋白表达及 SDS-PAGE 鉴定 取阳性重组质粒的表达菌 37 ℃ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 于 37 ℃ 诱导 5 h,10000 r/min 离心收菌,超声破碎,然后离心收集上清裂解液和沉淀,通过 SDS-PAGE 电泳分析,确定重组蛋白是可溶性表达还是包涵体表达。

2.2.2 重组蛋白的 Ni-NTA 树脂纯化 重组蛋白大量表达后,利用 HIS 蛋白纯化试剂盒进行纯化,并用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯化的效果,用 BCA 试剂盒测定纯化后的蛋白浓度。

2.3 重组蛋白的 Western blot 分析 纯化的重组 N 蛋白,pET32a 空载体诱导表达菌经过 SDS-PAGE 电泳,再转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,1% BSA 37 ℃ 封闭 1 h, PBST 洗膜 3 次,加 prrsv-GDr180 阳性猪血清(1:200 稀释)于 37 ℃ 孵育 1 h,洗膜 3 次,再加 HRP 标记的羊抗猪 IgG(1:10000 稀释)于室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后用 HRP-DAB 底物显色试剂避光显色 10 min,观察结果。

2.4 ELISA 反应条件的优化

2.4.1 通用的 ELISA 程序 以抗原包被液稀释抗原,100 μ L/孔 4 ℃ 包被过夜;PBST 洗板 3 次,加入封闭液 200 μ L/孔,37 ℃ 封闭 1 h, PBST 洗板 4 次,拍干。加入稀释的一抗血清 100 μ L/孔,37 ℃ 反应 1 h,用 PBST 洗板 4 次;加入稀释的酶标抗体 100 μ L/孔,37 ℃ 作用 1 h,取出后用 PBST 洗液洗板 5 次;加入 TMB 显色液 100 μ L/孔,室温避光反应 15 min;加入终止液 50 μ L/孔;酶标仪 450 nm 处读取各孔读数。

2.4.2 抗原最适包被浓度和待检血清最佳稀释浓度的确定 采用方阵滴定法,用包被液将纯化后的 N 蛋白梯度稀释成 8.0、4.0、2.0、1.0 和 0.5 μ g/mL, 96 孔板上每个梯度包被 2 列孔;横向使用 PBS 将 PRRSV GDr180 株阴阳性血清作 1:50、1:100、1:200、1:400 稀释,使用酶标抗体在建议工作浓度下进行 ELISA 测定,选择阳性血清 OD_{450nm} 值在

1.0 左右,且阳性 OD_{450nm} 值/阴性 OD_{450nm} 值(P/N)比值最大时的抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。

2.4.3 包被方式的优化 将确定的最适抗原浓度分别以 4 ℃ 过夜、37 ℃ 作用 1 h 后 4 ℃ 过夜、37 ℃ 作用 2 h 后 4 ℃ 过夜和 37 ℃ 作用 2 h 这 4 种包被条件进行包被,然后进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为最佳包被方式。

2.4.4 封闭液的选择 用 BSA 和脱脂奶粉分别按 1%、2%、5% 三种浓度作为封闭液按照优化的试验条件进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为最佳封闭液。

2.4.5 抗原抗体最佳作用时间的确定 阴阳性血清在 37 ℃ 分别按 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为一抗最佳反应时间。

2.4.6 酶标抗体最佳作用时间确定 酶标抗体在 37 ℃ 按 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为酶标抗体最佳反应时间。

2.4.7 酶标抗体工作浓度优化 酶标抗体分别做 1:2500、1:5000、1:10000、1:15000、1:20000、1:25000 和 1:30000 7 个稀释度进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为酶标抗体工作液最佳反应时间。

2.4.7 TMB 底物反应时间的确定 加入 TMB 底物后,分别避光反应 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 值最大者判定 TMB 底物最佳反应时间。

2.5 临界值的确定 用建立的 ELISA 检测方法检测 52 份已判定为 PRRSV 抗体阴性的猪血清(IDEXX 试剂盒检测确定),根据阴性血清样品 OD_{450} 值计算其 SP 值的平均值($\bar{x}$)和标准差(s),以统计学原理确定 ELISA 阴阳性临界值。为了减少误差采用 S/P 值: $S/P = (\text{样品测定孔 } OD_{450} \text{ 值} - \text{阴性对照孔平均 } OD_{450} \text{ 值}) / (\text{阳性对照孔平均 } OD_{450} \text{ 值} - \text{阴性对照孔平均 } OD_{450} \text{ 值})$,根据统计学原理,确定阴阳性临界值, $CP = \bar{x} + 3s$; $CN = \bar{x} + 2s$,当待测样品的

SP 值 $\geq$ CP 时为阳性,<CN 时为阴性,介于两者之间为可疑。

2.6 特异性检测 利用优化后的条件,对猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪支原体 (MHP)、口蹄疫病毒 (FMD)、猪细小病毒 (PPV)、猪流行性乙型脑炎 (JE) 等对进行检测,判定上述血清是否会与试剂盒的抗原起交叉反应。

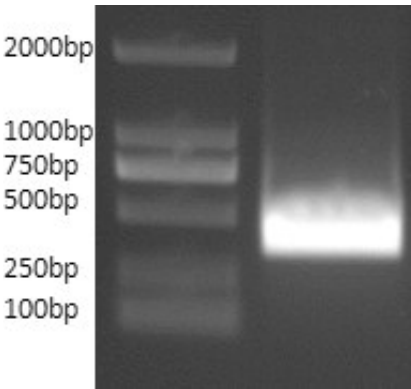
2.7 批内重复试验 用同一批次的 PRRSV N 蛋白包被酶标板,对 16 份血清进行检测,分别在第 1、3、7 天进行测定,每份血清做 3 个重复,结果取平均值。

2.8 批间重复试验 使用 3 批蛋白抗原分别包被 ELISA 板,对 16 份血清进行检测,每份血清做 3 个重复,结果取平均值;计算标准差和变异系数,分析其批间重复性。

2.9 与同种其他试剂盒之间的比较 利用建立的 ELISA 方法对临床送检的 196 份猪血清进行检测,同时用商品化 IDEXX PRRSV 抗体检测试剂盒做平行检测,对两种方法的结果进行比较。

3 结 果

3.1 重组蛋白基因质粒的构建 通过 RT-PCR 成功扩增到 N 蛋白的基因片段,大小为 372 bp,见图 1。重组阳性质粒 PCR 鉴定,双酶切均鉴定为阳性,通过比对测序结果,确定重组蛋白基因质粒构建成功。



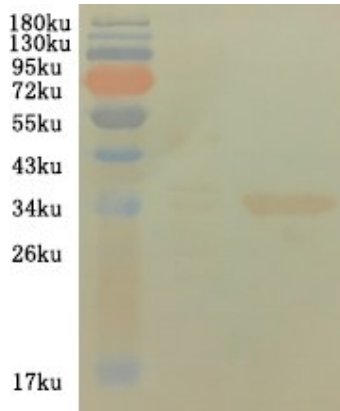
M:蛋白分子质量标准 1:N 蛋白的基因片段

图 1 N 蛋白的基因片段凝胶电泳分析

Fig 1 Gene fragment gel electrophoresis analysis of N protein

3.2 重组蛋白的表达及纯化 对表达产物进行 SDS-PAGE 鉴定分析后,确认重组蛋白是以可溶性蛋白方式存在的,通过 Ni-NTA 树脂纯化后,SDS-PAGE 鉴定分析后,确认纯化效果良好,并用 BCA 法测定纯化后蛋白浓度,约为 0.25 mg/mL。

3.3 重组蛋白的 Western blot 分析 重组蛋白在 PVDF 膜上,与 PRRSV GD 株高免阳性血清进行反应,显色后 PVDF 膜上可见到明显的目的条带 (图 2),表明重组蛋白跟 PRRSV 阳性血清能发生特异性反应,有良好的反应原性,可作为包被抗原进行下一步方法的建立。



M:蛋白分子质量标准;1:pet32a 空载体;2:pet-32a-N 重组蛋白

图 2 重组蛋白的 Western blot 分析

Fig 2 Western blot analysis of recombinant protein

3.4 ELISA 反应条件的优化

3.4.1 抗原最适包被浓度和待检血清最佳稀释浓度的确定 由表 1 可知,当抗原包被浓度为 1 μ g/mL,血清以 1 : 50 稀释时,阳性 OD 值在 1.0 左右,且 P/N 值较大。

3.4.2 包被方式的优化 由表 2 可知,采取 37 $^{\circ}$ C 2 h+4 $^{\circ}$ C 过夜包被时,阳性 OD 值接近 1.0 左右,P/N 值最大,从而确定此为最佳包被方式。

3.4.3 封闭液的选择 由表 3 可知,采用 2%脱脂奶粉作为封闭液时,P/N 值最大,故此为最佳封闭液。

3.4.4 抗原抗体最佳作用时间确定 当血清反应条件为 37 $^{\circ}$ C 60 min 时,P/N 值最大,此时条件为最佳。

表 1 抗原包被浓度和血清稀释倍数的优化结果

Tab 1 Optimized results of antigen coating concentration and serum dilution factor

血清稀释度	检测项	不同抗原包被浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)测定结果				
		0.5	1	2	4	8
1 : 50	P	0.628	1.056	1.672	2.336	2.642
	N	0.197	0.268	0.458	0.757	1.192
	P/N	3.189	3.940	3.651	3.086	2.216
1 : 100	P	0.492	0.730	1.146	1.983	2.533
	N	0.164	0.223	0.402	0.633	1.066
	P/N	3.00	3.274	2.851	3.133	2.376
1 : 200	P	0.374	0.649	1.089	1.935	2.316
	N	0.139	0.199	0.345	0.574	0.894
	P/N	2.691	3.261	3.157	3.371	2.591
1 : 400	P	0.307	0.584	0.915	1.767	2.167
	N	0.131	0.216	0.349	0.553	0.797
	P/N	2.344	2.704	2.622	3.195	2.719

表 2 包被方式的优化结果

Tab 2 Optimized results of coating mode

检测项	4℃ 过夜	37℃ 1h+4℃ 过夜	37℃ 2 h+4℃ 过夜	37℃ 2 h
P	0.957	0.951	0.974	0.739
N	0.166	0.160	0.162	0.143
P/N	5.777	5.946	6.002	5.182

表 3 封闭液的优化结果

Tab 3 Optimized results of closed liquid

检测项	BSA			脱脂奶粉		
	1%	2%	5%	1%	2%	5%
P	1.595	1.598	1.622	1.468	1.707	1.662
N	0.484	0.581	0.434	0.506	0.442	0.540
P/N	3.295	2.753	3.740	2.901	3.862	3.081

表 4 抗原抗体作用时间的优化结果

Tab 4 Optimized results of antigen-antibody action time

检测项	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
P	0.439	0.616	0.853	0.973	1.085	1.219
N	0.166	0.206	0.221	0.228	0.257	0.289
P/N	2.639	2.997	3.866	4.261	4.226	4.223

3.4.5 酶标抗体最佳作用时间确定 由表 5 可知,当二抗反应条件为 37 ℃ 90 min 时,P/N 值最大,此时条件为最佳。

3.4.6 酶标抗体工作浓度优化 由表 6 可知,当稀释度为 15000 倍时,P/N 值最大,此时为最优。

3.4.6 TMB 底物反应时间的确定 由表 7 可知,当显色条件为室温下 15 min 时,P/N 值最大,此时条

件最佳。

3.5 临界值的确定 用优化的试剂盒检测 52 份阴性血清及标准阳性血清和标准阴性血清,其中测的标准阳性血清 OD₄₅₀ 值为 1.157,标准阴性血清 OD₄₅₀ 值为 0.269;结合表 8 结果,根据统计学原理确定其临界值是:当待测样品的 SP 值≥0.172 时为阳性,SP 值<0.085 时为阴性,介于两者之间为可疑。

表 5 酶标二抗作用时间的优化结果

Tab 5 Optimized results of enzyme-labeled antibody action time						
检测项	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
P	0.121	0.203	0.354	0.500	0.724	0.963
N	0.051	0.061	0.075	0.093	0.130	0.159
P/N	2.357	3.352	4.720	5.357	5.581	6.044

表 6 酶标二抗工作浓度的优化结果

Tab 6 Optimized results of enzyme labeled antibody action time							
检测项	不同稀释倍数的测定结果						
	2500	5000	10000	15000	20000	25000	30000
P	2.270	1.741	1.168	0.999	0.745	0.623	0.602
N	0.545	0.372	0.225	0.185	0.147	0.128	0.124
P/N	4.168	4.685	5.190	5.392	5.082	4.855	4.865

表 7 TMB 底物反应时间的优化结果

Tab 7 Optimized results of TMB substrate reaction time						
检测项	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
P	0.993	1.104	1.348	1.294	1.246	1.189
N	0.139	0.150	0.162	0.182	0.193	0.167
P/N	7.141	7.340	8.302	7.095	6.454	7.104

表 8 52 份阴性血清的检测结果

Tab 8 Detection results of 52 negative sera									
血清序号		OD 值							
1-9	0.068	0.184	0.352	0.215	0.175	0.235	0.223	0.141	0.150
10-18	0.201	0.205	0.209	0.298	0.149	0.143	0.170	0.185	0.212
19-27	0.133	0.147	0.097	0.223	0.135	0.161	0.090	0.248	0.100
28-36	0.222	0.069	0.299	0.183	0.355	0.152	0.108	0.242	0.150
37-45	0.337	0.194	0.261	0.180	0.161	0.396	0.105	0.319	0.150
46-52	0.113	0.151	0.242	0.148	0.139	0.114	0.300		

3.6 特异性检测 ELISA 检测伪狂犬病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪肺炎支原体 (MHP)、口蹄疫病毒 (FMD)、猪细小病毒 (PPV)、猪乙型脑炎病毒 (JEV)、猪圆环病毒 2 型病毒 (PCV2) 标准阳性血清, 结果各个血清的 SP 值均小于 0.085 (表 9), 表明上述血清与建立的 PRRSV 抗体试剂盒不发生交叉反应, 证明建立的 ELISA 检测方法特异性较好。

3.7 批内重复试验 对于同一份血清, 分别在第

1、3、7 天检测, 试验一共选取 16 份血清, 结果见表 10。可以看出, 每份血清检测结果的变异系数在 1.0%~8.8% 之间, 均小于 10%, 表明建立的 ELISA 检测方法批内稳定性较好。

3.8 批间重复试验 同一份血清均用 3 个不同批次蛋白包被的 ELISA 板进行检测, 一共选取 16 份血清进行检测。表 11 结果显示, 其变异系数在 1.1%~9.3% 之间, 均小于 10%, 表明建立的 ELISA 检测方法批间稳定性较好。

表 9 特异性检测结果
Tab 9 Specific test result

检测项	PRV	CSFV	MHP	FMD	PPV	JEV	PCV2
SP 值	0.072	0.140	-0.125	-0.135	0.067	-0.070	0.082
判定结果	-	-	-	-	-	-	-

表 10 批内重复试验结果
Tab 10 Repeated test results within the batch

血清编号	第 1 天	第 3 天	第 7 天	平均值	标准方差	变异系数/%
1	0.402	0.394	0.398	0.398	0.004	1.0
2	0.155	0.159	0.163	0.159	0.004	2.5
3	0.386	0.382	0.335	0.368	0.028	7.7
4	1.798	1.859	1.745	1.800	0.057	3.1
5	0.537	0.604	0.619	0.587	0.044	7.4
6	0.923	0.978	0.936	0.950	0.039	4.1
7	0.923	0.920	0.885	0.909	0.021	2.3
8	0.464	0.489	0.411	0.455	0.040	8.8
9	0.172	0.187	0.181	0.180	0.008	4.2
10	0.130	0.123	0.128	0.127	0.004	2.8
11	1.842	1.833	1.785	1.820	0.031	1.6
12	0.212	0.236	0.214	0.220	0.013	6.0
13	0.161	0.173	0.160	0.164	0.007	4.3
14	0.170	0.181	0.188	0.180	0.009	5.1
15	0.115	0.121	0.127	0.121	0.006	4.9
16	0.129	0.146	0.127	0.134	0.010	7.8

表 11 批间重复试验结果

Tab 11 Repeat test results between batches

血清编号	第 1 批	第 2 批	第 3 批	平均值	标准方差	变异系数/%
1	0.402	0.427	0.362	0.397	0.033	8.3
2	0.155	0.169	0.151	0.158	0.009	5.8
3	0.386	0.386	0.327	0.366	0.034	9.3
4	1.798	1.628	1.523	1.649	0.139	8.4
5	0.537	0.805	0.916	0.860	0.078	9.1
6	0.923	0.911	0.987	0.940	0.041	4.4
7	0.923	0.911	0.987	0.940	0.041	6.4
8	0.464	0.474	0.490	0.476	0.013	2.8
9	0.172	0.163	0.157	0.164	0.008	4.8
10	0.130	0.130	0.135	0.131	0.003	2.3
11	1.842	1.867	1.990	1.899	0.079	4.2
12	0.212	0.214	0.230	0.219	0.010	4.6
13	0.161	0.159	0.146	0.155	0.008	5.4
14	0.170	0.189	0.160	0.173	0.015	8.7
15	0.115	0.118	0.117	0.117	0.001	1.1
16	0.129	0.145	0.128	0.134	0.010	7.2

3.9 与同种其他试剂盒之间的比较 利用本试验建立的间接 ELISA 方法和 IDEXX PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒同时检测 196 份血清样品,结果见表 12。本试验建立的间接 ELISA 检测方法检测出阳性血清 28 份,阳性率为 14.2%;用 IDEXX PRRSV ELISA 试剂盒检出阳性血清 34 份,阳性率为 17.3%;两者均检出阳性的样品为 22 份,均阴性的样品 156 份,两者的符合率为 91%,表明本实验建立的 ELISA 检测方法具有较高的准确性。

表 12 两种检测方法的符合率比较

Tab 12 Comparison of two test methods

IDEXX 试剂盒	N 蛋白-ELISA 检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	22	12	34
阴性	6	156	162
合计	28	168	196
总符合率/%		91%	

4 分析与讨论

目前常通过 PRRSV 血清抗体检测及时进行流行病学监测来控制该病。而在中和试验(SN)、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、间接免疫荧光(IFA)及多种 ELISA 抗体检测方法中,ELISA 是最为常用的 PRRS 抗体检测方法。

本研究首次以 PRRSV GDr180 毒株作为模板,顺利表达出了具有良好抗原性的 PRRSV 重组 N 蛋白。选用 N 蛋白作为 ELISA 方法的包被抗原是因为在 PRRSV 几种蛋白中,PRRSV N 蛋白在不同型毒株中有很高的同源性,是保守性很好的蛋白,以重组 N 蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 试剂盒,其生物安全性好,不会有散毒的危险,相对生产成本较低,方便规模化生产。大肠杆菌表达系统具有比较清楚的遗传背景、培养周期短、表达量高、抗污染能力强等优点^[14]。PET 系统是在大肠杆菌中表达外源蛋白最高效、产量最高、成功率最高的表达载体。其是利用与启动子配套并且能高效转录特定基因的外源 RNA 聚合酶构建的 T7RNA 聚合酶/启动子系统,可以从各种基因生产大量的目的蛋

白^[15]。另外, pET-32a(+) 载体的 SD 序列下游有 TrxA 基因与外源插入基因相连, 外源基因表达时, 表达产物融合了 TrxA 基因编码的硫氧还蛋白, 从而不易被大肠杆菌蛋白酶降解, 有利于外源蛋白的稳定存在。融合蛋白含有 His 组氨酸标签结构, 可与镍亲和树脂吸附, 便于后续的蛋白质纯化。本研究即是用 pet-32a(+) 表达载体, 顺利表达出了具有良好抗原性的 PRRSV 重组 N 蛋白。

用重组 N 蛋白作为包被抗原, 通过优化 ELISA 检测方法的各种条件, 建立了检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 检测方法, 建立的方法特异性试验检测 CSFV、JEV、FMDV、PRV、PPV、PCV2 等多种常见猪病病原的阳性血清均为阴性, 表明建立的 ELISA 方法特异性很好, 批内与批间重复性试验的变异系数均小于 10%, 表明建立的 ELISA 检测方法稳定性较好。而且同 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒进行了对比, 相对特异性高达 96%, 两者之间符合率达到 91%; 国内也有相应的试剂盒已开发出来, 但与 IDEXX 试剂盒相比, 主要问题是批间差异较大, 稳定性不佳, 包被蛋白的纯度直接影响方法的特异性, 不同批次的包被蛋白的纯度差异是影响批间差异的主要因素, 所以优化蛋白纯化条件及确定稳定的蛋白纯化工艺可以有效解决目前试剂盒存在的主要问题, 针对本次建立的方法, 在接下来的实验中, 会在蛋白纯化, 抗原保护剂, 抗体稀释液等等关键工艺上进行筛选优化, 期望能使建立的方法在特异性, 稳定性方面有所提升, 以开发出发稳定性更好, 灵敏性更强, 检测结果更准确的 PRRSV 抗体检测试剂盒。

参考文献:

- [1] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae[J]. Archives of Virology, 1997, 142(3): 629.
- [2] Jourdan S S, Osorio F, Hiscox J A. An interactome map of the nucleocapsid protein from a highly pathogenic North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain generated using SILAC-based quantitative proteomics[J]. Proteomics, 2012, 12(7): 1015-1023.
- [3] Van Vugt J J, Storgaard T, Oleksiewicz M B, et al. High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity[J]. Journal of General Virology, 2001, 82(11): 2615-2620.
- [4] Bian T, Sun Y, Hao M, et al. A recombinant type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus between NADC30-like and a MLV-like: genetic characterization and pathogenicity for piglets[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 54: 279-286.
- [5] 高志强, 郭鑫, 杨汉春. 猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组遗传变异研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2002, 4(6): 64-67. Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Advances in genetic variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genome[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2002, 4(6): 64-67.
- [6] Meulenbergh J J, Hulst M M, De Meijer E J, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV[J]. Virology, 1993, 192(1): 62-72.
- [7] Johnson C R, Griggs T F, Gnanandarajah J, et al. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses[J]. Journal of General Virology, 2011, 92(5): 1107-1116.
- [8] Wu W H, Fang Y, Farwell R, et al. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b[J]. Virology, 2001, 287(1): 183-191.
- [9] Wootton S K, Yoo D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages[J]. Journal of Virology, 2003, 77(8): 4546-4557.
- [10] Venteo A, Rebollo B, Sarraesca J, et al. A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 181(1): 109-113.
- [11] Wang X, Bai J, Zhang L, et al. Poly(A)-binding protein interacts with the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and participates in viral replication[J]. Antiviral Research, 2012, 96(3): 315-323.
- [12] Tan F, Wei Z, Li Y, et al. Identification of non-essential regions in nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for replication in cell culture[J]. Virus Research, 2011, 158(1/2): 62-71.
- [13] Cai J P, Wang Y D, Tse H, et al. Detection of asymptomatic antigenemia in pigs infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by a novel capture immunoassay

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.04

腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达及其免疫效力评价

彭国瑞, 彭小兵*, 李旭妮, 董令赢, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-09-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0026-07 [中图分类号] S852.44

[摘要] 为获得腐败梭菌 α 毒素和 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达产物, 并鉴定其致死活性和反应原性, 评价其免疫保护效力, 利用 PCR 扩增腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因 Gcsa 和 Gcpe 并克隆至 pETDuet-1 质粒, 转化 *E.coli* BL21(DE3), 自诱导培养基诱导这 2 段基因共表达; 用 SDS-PAGE 和 Western-blot 以及小鼠毒性试验、抗毒素血清中和试验对表达产物进行鉴定; 将诱导后的大肠杆菌灭活, 制成铝佐剂疫苗 1 mL/只皮下注射免疫家兔 2 次, 测定免疫血清中和抗体效价, 用 1 MLD 的腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素分别攻击。结果显示, 所构建的 *E.coli* BL21(pETDuet-Gcsa-Gcpe) 可以同时表达 Gcsa 和 Gcpe, 表达产物能够与腐败梭菌和 D 型产气荚膜抗毒素血清反应; 且具有小鼠致死毒性, 只有用 2 种抗毒素一同作用, 才能将其毒性中和; 制成灭活疫苗免疫家兔, 免疫血清对腐败梭菌毒素的中和抗体效价为 2 MLD/0.1 mL, 对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和抗体效价 ≥ 50 MLD/0.1 mL; 用 2 种毒素攻击, 免疫组家兔全部保护, 对照组全部死亡, 达到《中华人民共和国兽药典》(2015 版) 效力检验标准。结果表明, 所构建的表达载体可以实现 α 毒素和 ϵ 毒素的活性共表达, 本研究为腐败梭菌和产气荚膜梭菌的多联基因工程灭活疫苗的研究提供了实验基础。

[关键词] 腐败梭菌; 产气荚膜梭菌; α 毒素; ϵ 毒素; 共表达; 免疫; 疫苗

Evaluation Immune Efficacy of Co-expression of *Clostridium septium* α -toxin and *Clostridium perfringens* ϵ -toxin

PENG Guo-rui, PENG Xiao-bing*, LI Xu-ni, DONG Ling-ying, JIANG Yu-wen*

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

Corresponding author: PENG Xiao-Bing, E-mail: pengxiaobing@ivdc.org.cn; JIANG Yu-Wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

基金项目: 国家重点研发计划“牛羊重要细菌病新型疫苗及其工艺研究(2017YFD0500905)”

作者简介: 彭国瑞, 助理研究员, 从事兽用生物制品检验。

通讯作者: 彭小兵, E-mail: pengxiaobing@ivdc.org.cn; 蒋玉文, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

with monoclonal antibodies against the nucleocapsid protein of PRRSV[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2009, 16(12): 1822-1828.

[14] Dea S, Gagnon C, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European

isolates [J]. Archives of Virology, 2000, 145(4): 659-688.

[15] Dong X, Tang B, Li J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (Glycine max) seed ferritin complex in *Escherichia coli* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(2): 299-307.

(编辑:李文平)