

网络出版时间:2012-06-08 16:03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120608.1603.024.html>

猪细小病毒 NS1 蛋白的截短表达与间接 ELISA 诊断方法的建立

田莉莉, 李 丽

(辽宁医学院 畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121000)

【摘要】 **【目的】** 建立一种快速检测猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)野毒抗体的方法。**【方法】** 参照已发表的 PPV 基因组(AY502114.1)序列设计合成特异性引物,利用 PCR 扩增 PPV NS1 基因主要抗原区域,将目的片段定向克隆至表达载体 pET30a(+),转化 BL21(DE3)表达菌,用 IPTG 诱导表达重组蛋白。以该蛋白作为诊断抗原,经过对间接 ELISA 条件的优化,建立检测 PPV 抗体的 NS1-ELISA 诊断方法,对该方法的特异性、敏感性、重复性进行检测。用建立的 PPV NS1-ELISA 诊断方法和血凝抑制试验(HI)同时对临床送检的 306 份血清样品进行检测,比较二者的符合率。**【结果】** 成功扩增了 870 bp 的 NS1 基因部分片段,构建了 pET30a-NS1 原核表达载体,获得了以包涵体形式表达的重组蛋白。该重组蛋白具有良好的抗原性和特异性。以纯化蛋白作为诊断抗原,建立了检测猪细小病毒抗体的 NS1-ELISA 诊断方法。该方法与猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪乙脑病毒(JEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪瘟病毒(CSFV)等 7 种常见猪病病毒的阳性血清均不发生反应;该方法检测敏感性为 1:12 800;批内重复性试验和批间重复性试验中样品的变异系数分别小于 5%和 10%。PPV NS1-ELISA 检测方法与 HI 的符合率为 96.2%。**【结论】** 制备了 NS1 重组蛋白,该蛋白具有良好的免疫原性,以其作为包被抗原建立的 PPV NS1-ELISA 诊断方法具有良好的重复性、敏感性和特异性,为 PPV 的快速诊断和流行病学调查等提供了一种快速、简便的血清学诊断方法。

【关键词】 猪细小病毒;NS1 蛋白;截短表达;间接 ELISA 诊断方法

【中图分类号】 S855.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)07-0032-07

Development of an indirect ELISA for detecting antibodies to porcine parvovirus using recombinant truncated NS1 protein expressed in *E. coli*

TIAN Li-li, LI Li

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: **【Objective】** The study developed a method for quick detection of porcine parvovirus antibody. **【Method】** NS1 gene major antigen region was amplified by RT-PCR technique with specific primers based on published PPV genome sequence(AY502114.1). Then the target fragment was directly cloned into pET30a(+) vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The recombinant proteins were expressed after induced by IPTG. Using the purified recombinant NS1 protein as coating antigen, an indirect NS1-ELISA was developed to detect antibody to PPV, and to test the specificity, sensitivity and repeatability of the method. With the established PPV antibody NS1-ELISA diagnosis method and hemagglutination inhibition test (HI), 306 serum samples were detected, and its coincidence rate was

* [收稿日期] 2011-12-14

[作者简介] 田莉莉(1982—),女,辽宁锦州人,讲师,硕士,主要从事预防兽医学研究。

compared.【Result】870 bp NS1 gene fragments were successfully amplified,prokaryotic expression vector pET30a-NS1 was constructed,and a recombinant protein in inclusion body forms was obtained. After denaturation,purification and renaturation,the purified recombinant protein retained better antigenicity and specificity. An indirect ELISA was successfully developed using the purified recombinant NS1 protein as coating antigen. The method showed no cross-reaction with the positive sera of other seven swine diseases (PCV-2,PRV,PRRSV,JEV,PEDV,TGEV,CSFV). The sensitivity of the method was 1 : 12 800. Coefficient of variability percent ($C.V\%$) of intro-batch and inter-batch duplicative tests was less than 5% and 10%, respectively. Compared with the HI,the concordance was 96.2%.【Conclusion】Recombinant NS1 protein was prepared. This recombinant protein has a good immunogenicity. The NS1-ELISA has good repeatability,sensitivity and specificity,which could be used as a simple and rapid serology detection method to monitor anti-PPV antibody and epidemiologic survey of PPV.

Key words: porcine parvovirus;NS1 protein;truncated expression;indirect ELISA diagnosis

猪细小病毒病(Porcine parvovirus infection,PPI)是由猪细小病毒(Porcine parvovirus,PPV)引起的,是导致仔猪多系统衰竭综合症的主要疾病之一,临床表现为妊娠母猪早产、流产、死胎、木乃伊胎、畸形胎、弱仔、产仔不足及母猪不育等繁殖障碍^[1-2]。该病最早于 1966 年发现于英国,1967 年 Cartwright 等^[3]从猪流产的胎儿中分离出 PPV,首次证明了它的致病作用。随后日本、荷兰、丹麦、美国、澳大利亚等国家先后报道了该病^[4]。我国自 20 世纪 80 年代以来从各地相继分离到 PPV^[5]。目前,PPV 在世界各地均有分布,并常与其他病原,如猪圆环病毒(PCV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)等混合感染而致病^[6-8],给养猪业带来巨大的经济损失。因此,加强 PPV 诊断技术的研究对预防和控制 PPI 具有重要的意义。

PPV 属于细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒属(*Parvovirus*),为单股线状 DNA 病毒,基因组全长为 5.0 kb,包括 2 个主要的开放阅读框架(ORF),3'端的 ORF 编码 3 个结构蛋白(VP1、VP2、VP3),5'端的 ORF 编码 3 个非结构蛋白(NS1、NS2、NS3)^[9-10]。NS1 是 PPV 最主要的非结构蛋白,不仅参与和促进病毒 DNA 复制及病毒衣壳蛋白的合成,还具有抑制多种异源启动子的作用,并在 NS2 的协同作用下对转化细胞有直接毒性作用^[11-13]。在 PPV 的防疫方面,我国普遍使用 PPV 灭活疫苗,该疫苗诱导机体产生抗结构蛋白抗体,而不产生抗非结构蛋白抗体,但自然感染野毒却可诱导机体同时产生抗结构蛋白抗体与抗非结构蛋白抗体,因此可用检测抗 NS1 蛋白的抗体水平,来区别灭活疫苗免疫猪与自然感染野毒猪^[14-16]。苏乾莲

等^[17]采用原核表达载体 pET32a 成功表达了 PPV-N 株 NS1 全基因(2.2 kb),但表达效率较低。冉旭华等^[18]选择 PPV NS1 基因主要抗原表位区在大肠杆菌中进行了高效表达,且获得的表达产物具有良好的反应原性。鉴于此,本研究对 NS1 基因主要抗原区域(长度为 870 bp,为了叙述方便,后文均以 NS1 基因代替)进行了截短表达,并建立了间接 ELISA 诊断方法,以期 PPV 野毒感染抗体检测试剂盒及鉴别诊断试剂盒的研制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、病毒、细胞与血清 克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21(DE3)、表达载体 pET30a(+)及 PPV 毒株,均由辽宁医学院畜牧兽医实验室保存。猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、PRV、PRRSV、猪乙脑病毒(JEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪瘟病毒(CSFV)阳性血清和 PPV 参考阴、阳性血清及检测用血清样品,均由辽宁医学院畜牧兽医实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Ex Taq 酶、pMD18-T 克隆载体及其他限制性内切酶,均购自宝生物(大连)工程有限公司;兔抗猪 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体、低分子质量蛋白 Marker、TEMED,均购自北京鼎国生物技术有限公司;蛋白酶 K、质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒,均购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 公布的 PPV 基因组(AY502114.1)序列,利用 oligo 6.2 软件设计合成了 1 对特异性引物:P1 5'-ATAG-GATCCCACTGCCATGTACTACTAGG-3',P2 5'-

ATTCAAGCTTTTCACATTGGCTGCATTGTA-3', P1、P2 下划线部分分别表示引入的 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 病毒基因组 DNA 的提取

取保存的 PPV 535 μ L, 加 60 μ L 100 g/L SDS 和 5 μ L 蛋白酶 K(终质量浓度为 200 μ g/mL), 56 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 分别用酚-氯仿-异戊醇、氯仿-异戊醇、氯仿各抽提 1 次, 向上清液中加入异丙醇沉淀 DNA, 用体积分数 75% 乙醇洗涤 2 次, 风干后加 60 μ L 灭菌去离子水, 用紫外分光光度计测定 DNA 纯度及浓度后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 NS1 基因的 PCR 扩增与克隆

以提取的 PPV 基因组 DNA 为模板, 同时设立对照(以 ddH₂O 为模板), 进行 PCR 反应, PCR 反应体系为: Ex Taq 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer 5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物 P1、P2 (20 μ mol/ μ L) 各 0.5 μ L, DNA 6 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。取扩增产物 5 μ L, 在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳, 利用凝胶成像系统扫描进行初步鉴定。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段, 纯化后与 pMD18-T 克隆载体于 4 $^{\circ}$ C 过夜连接, 取连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 挑取单菌落过夜培养, 用质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒, 经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定得到阳性重组质粒 pMD18-T-NS1, 送生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。

1.4 NS1 基因表达载体的构建与鉴定

利用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切 pMD18-T-NS1, 回收 NS1 基因片段并将其定向克隆到经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切的表达载体 pET30a(+) 中, 取连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 挑取单菌落过夜培养, 用质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒, 经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定后获得重组表达载体 pET30a-NS1。将鉴定为阳性的克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序, 以验证其阅读框架。

1.5 NS1 重组蛋白的表达与纯化

将 pET30a-NS1 转化表达菌 BL21(DE3) 感受态, 采用不同浓度(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mmol/L) 诱导剂 IPTG、不同时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h)、不同温度(27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 $^{\circ}$ C) 诱

导 pET30a-NS1 重组蛋白的表达, 对表达产物用 120 g/L 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定最佳诱导剂浓度、诱导时间、诱导温度。将转化 pET30a-NS1 的 BL21(DE3) 感受态以最佳条件诱导表达后, 超声破碎(超声波作用 10 s, 间隔 10 s, 共作用 30 次) 细胞。然后于 12 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液及沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 鉴定目的蛋白是以可溶性形式存在于上清液中还是以包涵体形式存在于沉淀中。对以包涵体形式表达的重组蛋白用 8 mol/L 尿素进行变性处理, 包涵体溶解后采用镍离子亲和层析法纯化, 将纯化后的蛋白利用透析袋复性, 对复性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。采用 Bradford 法测定纯化蛋白的质量浓度。

1.6 NS1 重组蛋白的 Western blot 检测

纯化的 NS1 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析后, 转印至硝酸纤维素膜上, 用 50 g/L 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 加 PPV 阳性血清(1:100 稀释) 于室温下作用 1 h, TBST 缓冲液洗 3 次, 加入 HRP 标记抗体(1:4 000 稀释) 37 $^{\circ}$ C 作用 50 min, TBST 缓冲液洗 3 次, 在二氨基联苯胺(DAB) 缓冲溶液中显色 10 min。同时设 pET30a(+) 诱导表达菌对照。

1.7 PPV 间接 ELISA 诊断方法(NS1-ELISA) 的建立

1.7.1 反应条件的优化 在相同的反应条件下, 分别将重组抗原的不同稀释度(100 倍、200 倍、400 倍、800 倍) 与待检样品的不同稀释度(50 倍、100 倍、200 倍、400 倍)、不同封闭液(10 g/L BSA、50 g/L 脱脂奶粉、体积分数 10% 小牛血清、PBST) 与不同封闭时间(30, 60, 90, 120 min)、二抗(HRP 标记抗体) 不同稀释度(3 000 倍、4 000 倍、5 000 倍、6 000 倍) 与不同作用时间(30, 60, 90, 120 min) 组成方阵滴定试验, 以阳性血清 $OD_{450} \approx 1.0$ 、阴性血清 $OD_{450} < 0.2$ 、阳性血清 OD_{450} /阴性血清 OD_{450} (P/N 值) 最大为选择标准, 确定重组抗原最佳包被浓度与待检样品最佳稀释度、最佳封闭液与最佳封闭时间、二抗最佳稀释度与最佳作用时间。在相同反应条件下, 一抗(待检样品) 分别作用 30, 60, 90, 120 min, 以阳性血清 $OD_{450} \approx 1.0$ 、阴性血清 $OD_{450} < 0.2$ 、 P/N 值最大为选择标准, 确定一抗(待检样品) 的最佳作用时间。在相同反应条件下, 底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 分别显色 5, 10, 15, 20 min, 以阳性血清 $OD_{450} \approx 1.0$ 、阴性血清 $OD_{450} < 0.2$ 、 P/N 值最大为选择标准, 确定 TMB 最佳作用时间。

1.7.2 结果判断标准的确定 在最佳反应条件下,利用 NS1-ELISA 检测 32 份已知 PPV 阴性血清样本,以样品号为横坐标,以 OD_{450} 值为纵坐标,绘制阴性样品 OD_{450} 数值分布图,并计算出 32 份阴性血清的 OD_{450} 平均值($\bar{x}$)和标准差(SD),本试验规定样本 $OD_{450} \geq (\bar{x} + 3SD)$ 时为阳性,样本 $OD_{450} < (\bar{x} + 2SD)$ 时为阴性,当 $(\bar{x} + 2SD) \leq$ 样本 $OD_{450} < (\bar{x} + 3SD)$ 为可疑,需重新检测样本,重新检测时样本 $OD_{450} \geq (\bar{x} + 2SD)$ 时判为阳性,样本 $OD_{450} < (\bar{x} + 2SD)$ 时判为阴性。

1.7.3 敏感性试验 将 PPV 标准阳性对照血清分别按 1 : 50,1 : 100,1 : 200,1 : 400,1 : 800,1 : 1 600,1 : 3 200,1 : 6 400,1 : 12 800,1 : 25 600,1 : 51 200 比例稀释,每个稀释度平行做 4 个重复,用建立的 PPV NS1-ELISA 检测,测定 OD_{450} 值,判定抗体的检出效价。

1.7.4 特异性试验 用间接 PPV NS1-ELISA 检测 PCV-2、PRV、PRRSV、JEV、PEDV、TGEV、CS-FV 阳性血清,同时设 PPV 标准阳性和阴性血清对照,确定重组抗原与其他常见猪病阳性血清是否发生交叉反应。

1.7.5 重复性试验 (1)批内重复性试验。选取 3 份 PPV 抗体阳性血清(编号分别为 1,2,3)和 3 份 PPV 抗体阴性血清(编号分别为 4,5,6),在相同试验条件下进行 PPV NS1-ELISA 检测,每份血清样

本平行做 6 个重复,对检测结果进行统计学分析。(2)批间重复性试验。选取 3 份 PPV 抗体阳性血清(编号分别为 1,2,3)和 3 份 PPV 抗体阴性血清(编号分别为 4,5,6),在相同试验条件下,于不同时间(1,2,3,4 d)下进行 PPV NS1-ELISA 检测,对检测结果进行统计学分析。

1.8 PPV NS1-ELISA 的实际应用

应用本试验建立的 PPV NS1-ELISA 及血凝抑制试验(HI),对来自辽宁、山东、河北等地的 306 份血清样本进行检测,比较 PPV NS1-ELISA 相对于 HI 的符合率,了解上述地区 PPV 野毒感染血清抗体的阳性率。

2 结果与分析

2.1 PPV NS1 基因的 PCR 扩增及其克隆载体、表达载体的鉴定

PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在约 870 bp 处可见特异性 DNA 扩增条带(图 1)。构建的重组质粒 pMD18-T-NS1 经 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切鉴定,获得了 870 bp NS1 基因片段和 2 200 bp 的 pMD18-T 克隆载体片段(图 2)。构建的重组表达载体 pET30a-NS1 经 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切鉴定,获得了 870 bp NS1 基因片段和 5 000 bp 的 pET30a(+)载体片段(图 3);测序结果表明,pET30a-NS1 阅读框架正确。

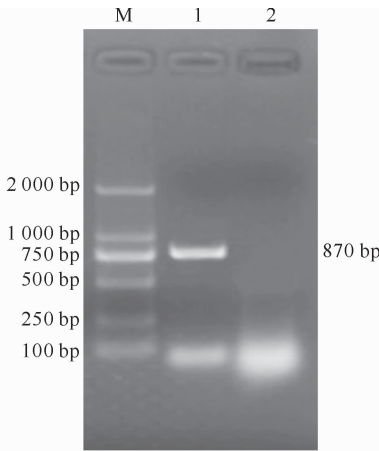


图 1 PPV NS1 基因部分片段的 PCR 扩增
M.DL2000 Marker;1.NS1 部分基因 PCR 扩增产物;2.对照
Fig.1 Result of PCR amplification of PPV NS1
M.DL2000 Marker;1.Product of PCR of PPV NS1;2.Control

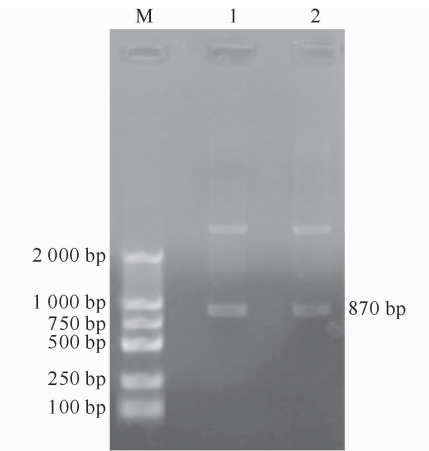


图 2 重组质粒 pMD18-T-NS1 的酶切鉴定
M.DL2000 Marker;1,2.重组质粒 pMD18-T-NS1 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切产物
Fig.2 Identification of recombinant cloning vector of pMD18-T-NS1
M.DL2000 Marker;1,2.pMD18-T-NS1 digested by *Bam*H I /*Hind* III

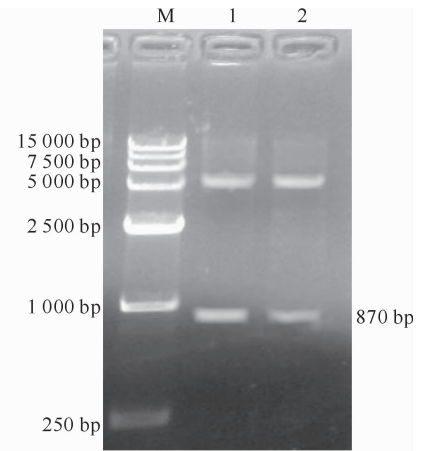


图 3 重组表达载体 pET30a-NS1 的酶切鉴定
M.DL15000 Marker;1,2.pET30a-NS1 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切产物
Fig.3 Identification of recombinant expression vector of pET30a-NS1
M.DL15000 Marker;1,2.pET30a-NS1 digested by *Bam*H I /*Hind* III

2.2 NS1 重组蛋白的表达及纯化

在最佳条件下(诱导温度为 37 ℃、IPTG 浓度为 1.0 mmol/L、诱导时间为 5 h)对 pET30a-NS1 诱导表达后,超声破碎细胞,分别收集上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,可见目的蛋白大部分都是包涵体形式存在的,包涵体经尿素变性、镍离子亲和层析法纯化及透析复性后进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示,获得了分子质量为 42 ku 的 NS1

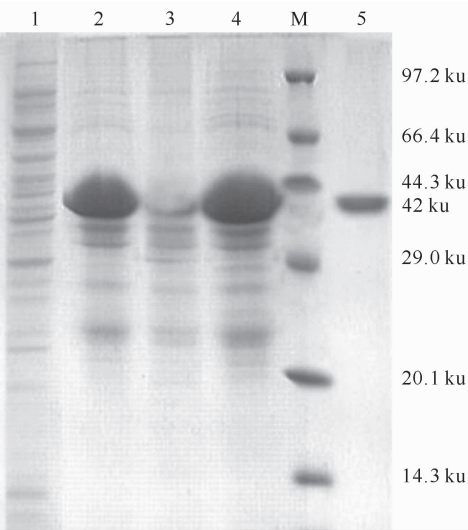


图 4 NS1 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
M. 标准蛋白 Marker;1. pET30a 表达产物;2. pET30a-NS1 表达产物;3. 超声破碎后上清液;4. 超声破碎后沉淀;5. 纯化蛋白
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombination protein NS1
M. Protein Marker;1. Expression product of pET30a;2. Expression product of pET30a-NS1;3. Supernatant after ultrasonic disruption;4. Pellets after ultrasonic disruption;5. Purified protein

2.4 PPV NS1-ELISA 检测条件的确定

2.4.1 最佳反应条件 试验结果显示,重组抗原最佳包被质量浓度为 4.78 μg/mL;最佳封闭液为含 10 g/L BSA 的 PBST,最佳封闭时间为 37 ℃下 1 h;血清样本最佳稀释度为 1:100,最佳作用时间为 37 ℃下 1 h;二抗最佳工作浓度为 1:5 000,最佳作用时间为 37 ℃下 1 h;底物最佳显色时间为 37 ℃下 10 min。

2.4.2 结果判定标准 32 份阴性血清样本经 PPV NS1-ELISA 检测后,以样品号为横坐标,以 OD_{450} 值为纵坐标,得到阴性样品 OD_{450} 数值分布图(图 6)。由图 6 可知,32 份样本的 OD_{450} 值主要分布在 0.10~0.30,占血清样本的 84.4%,可知数据分布合理,可以作为制定判定标准的依据。计算得出 32 份阴性血清样本 OD_{450} 平均值($\bar{x}$)和标准差(SD)分别为 0.210和 0.061。根据统计学原理, OD_{450} (样本) $\geq$

重组蛋白(图 4);Bradford 法测定纯化蛋白的质量浓度为 0.956 mg/mL。

2.3 NS1 重组蛋白的活性鉴定

取纯化后 NS1 重组蛋白,经 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素膜上,与 PPV 阳性血清作用,结果表明,该重组蛋白能与 PPV 阳性血清发生特异性反应,而空载体表达菌与 PPV 阳性血清没有反应(图 5)。

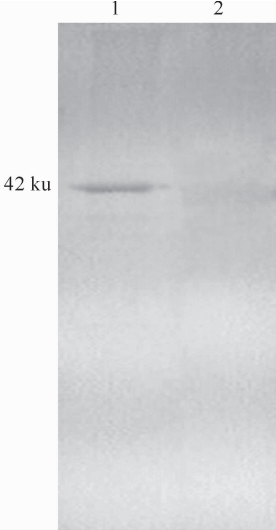


图 5 NS1 重组蛋白的 Western blot 检测
1. 纯化 NS1 重组蛋白与 PPV 阳性血清作用;
2. 空载体表达菌与 PPV 阳性血清作用
Fig. 5 Western blot of expressed products NS1
1. Purified protein reaction to positive serum;
2. Control of pET30a bacteria lysate

($\bar{x}+3SD$)时,可以在 99.9%的水平上判定为阳性。因此,得到的 PPV NS1-ELISA 检测时阴性和阳性判断标准:当样本 $OD_{450} \geq 0.393$ 时判为阳性;当样本 $OD_{450} < 0.332$ 时判为阴性;当 $0.332 \leq$ 样本 $OD_{450} < 0.393$ 时判为可疑。对可疑样本必须重新检测,重新检测时,样本 $OD_{450} \geq 0.332$ 为阳性。

2.5 PPV NS1-ELISA 敏感性、特异性、重复性的检测

2.5.1 敏感性 用建立的 PPV NS1-ELISA 检测 PPV 标准阳性对照血清,当血清稀释至 12 800 倍时,检测结果仍为阳性($OD_{450} = 0.412$)(图 7),证明所建立的方法具有较好的敏感性。
2.5.2 特异性 试验结果显示,NS1 重组抗原与常见 7 种猪病阳性血清反应的 OD_{450} 值均低于 0.332,呈阴性反应。表明 NS1 重组蛋白与常见 7 种猪病的阳性血清未发生交叉反应,显示出了很好的特异性。

2.5.3 重复性 试验结果显示,批内重复性试验样品的变异系数小于 5%(表 1);批间重复性试验样品的

的变异系数均小于 10%(表 2),说明 PPV NS1-ELISA 具有良好的重复性。

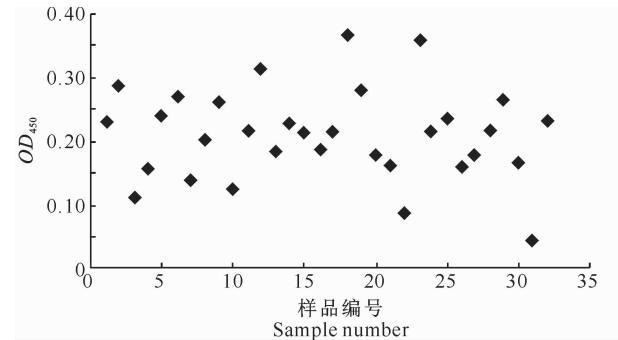


图 6 PPV NS1-ELISA 检测 32 份阴性样品 OD_{450} 值的分布情况

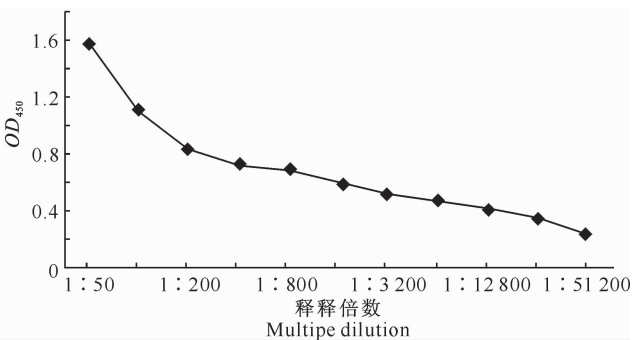


图 7 PPV NS1-ELISA 检测的敏感性试验结果
Fig. 7 Sensitivity of PPV NS1-ELISA

表 1 PPV NS1-ELISA 检测的批内重复性试验结果

Table 1 Intro-batch repetition test of PPV NS1-ELISA

样品 编号	OD_{450}						平均值 $\bar{x}$	标准差 SD	变异系数/% $C.V$
	1	2	3	4	5	6			
1	0.913	0.894	0.982	0.941	0.965	0.913	0.938	0.032 4	3.45
2	0.521	0.498	0.556	0.538	0.570	0.534	0.536	0.025 4	4.74
3	0.437	0.411	0.456	0.471	0.434	0.448	0.443	0.020 6	4.65
4	0.315	0.323	0.298	0.301	0.291	0.315	0.307	0.012 3	4.01
5	0.203	0.195	0.198	0.193	0.178	0.186	0.192	0.008 9	4.64
6	0.112	0.106	0.098	0.106	0.108	0.110	0.107	0.004 8	4.49

表 2 PPV NS1-ELISA 检测的批间重复性试验结果

Table 2 Inter-batch repetition test of PPV NS1-ELISA

样品编号	OD_{450}				平均值 $\bar{x}$	标准差 SD	变异系数/% $C.V$
	1 d	2 d	3 d	4 d			
1	0.912	0.881	0.982	0.956	0.933	0.045 0	4.82
2	0.584	0.512	0.507	0.541	0.536	0.035 3	6.59
3	0.481	0.402	0.452	0.421	0.439	0.034 8	7.93
4	0.286	0.331	0.312	0.294	0.306	0.020 0	6.54
5	0.174	0.192	0.181	0.201	0.187	0.011 9	6.36
6	0.096	0.112	0.105	0.094	0.102	0.008 3	8.14

2.6 PPV NS1-ELISA 临床应用结果

应用本试验建立的 PPV NS1-ELISA 检测了来自辽宁、山东、河北等地的 306 份血清样本,结果有 26 份呈阳性,阳性率为 8.50%。对于 PPV NS1-ELISA 检测的 26 份阳性样品,HI 检测为阳性的有 25 份,只有 1 份为阴性,二者符合率为 96.2%(25/26)。

3 讨 论

目前,PPV 的诊断方法主要包括病毒分离与鉴定方法、血清学方法及分子生物学方法。其中,血清学方法是检测 PPV 血清抗体的重要手段之一,其在 PPV 的早期检测、流行病学调查和监测等方面有着重要的作用。近年来,PPV 感染呈扩大、上升的趋势,给全球养猪业带来了巨大的经济损失,我国 PPV

的免疫预防主要使用灭活疫苗,而现有的 HI、血清中和试验(SN)、补体结合试验等常规血清学方法多以全病毒作为抗原,不能区分灭活疫苗免疫猪与野毒感染猪。灭活疫苗免疫不产生抗非结构蛋白抗体,因此通过检测 PPV 非结构蛋白 NS1 的抗体水平,就可区分灭活疫苗免疫猪与野毒感染猪。为此,本研究表达了 PPV 非结构蛋白 NS1,并以其作为包被抗原,建立了检测 PPV 抗体的 NS1-ELISA 诊断方法。

表达外源蛋白的系统虽然较多,但大肠杆菌表达系统具有培养方便、操作简单、成本低廉、表达量大、易于纯化、易于工业化批量生产等优点,是实验室获取重组蛋白的一种重要工具。由于 pET30a(+)原核表达载体所带的融合标签小,重组蛋白折叠时不易掩盖被研究蛋白的表位,能够保持

蛋白原有的反应性;此外,pET30a(+)原核表达载体的表达产物氨基端带有 6 个组氨酸融合标签,可以利用固定化金属离子亲和层析法纯化,纯化过程简单,易于大量制备。因此,本研究利用 pET30a(+)原核表达载体,表达了 PPV NS1 蛋白,经免疫印迹检测证实,所截短表达的 PPV NS1 蛋白具有良好的反应性与特异性,将其作为包被抗原建立的 NS1-ELISA 诊断方法与其他 7 种常见猪病的阳性血清未发生交叉反应,与 HI 相比较符合率为 96.2%。本研究建立的 PPV NS1-ELISA 具有较好的敏感性和特异性,显示出了良好的应用前景,本实验室预期将其组装成试剂盒,为 PPV 的综合防控提供技术支持。但本研究建立的 NS1-ELISA 需进一步优化完善:首先,NS1-ELISA 需要进行大量的样品检测,以精确地测定阳性检出率和假阳性率;其次,将 NS1-ELISA 与商品化 ELISA 试剂盒或其他 ELISA 检测方法进行比较,以便使该方法得到进一步改进,使其能更大范围的推广和应用,最终为我国 PPV 的诊断及鉴别诊断提供一种简便、快速的血清学诊断方法。

[参考文献]

- [1] Mengeling W L. Porcine parvovirus: Properties and prevalence of a strain isolated in the United States [J]. *Am J Vet Res*, 1972, 33(11): 2239-2248.
- [2] 沈志强,王金良,郭显坡,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测猪细小病毒方法的建立及初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(1): 11-15.
Shen Z Q, Wang J L, Guo X P, et al. Development and application of SYBR-Green I real-time quantitative PCR technique for detecting porcine parvovirus virus [J]. *Chin J Vet Sc*, 2011, 31(1): 11-15. (in Chinese)
- [3] Cartwright S F, Huck R A. Virus isolation is associated with herd infertility, abortion and stillbirth in pigs [J]. *Vet Rec*, 1967, 81: 196-197.
- [4] Cheung A K, Wu G, Wang D. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(5): 801-806.
- [5] 刘杉杉,赵亚荣,张超范,等. 猪细小病毒抗体 IPMA 检测方法的建立及应用 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(4): 387-391.
Liu S S, Zhao Y R, Zhang C F, et al. Establishment and application of immuneroxidase monolayer assay for detection of the antibody against poecine parvovirus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2011, 41(4): 387-391. (in Chinese)
- [6] Sharma R, Saikumar G. Porcine parvovirus and porcine circovirus 2 associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2010, 42(3): 515-522.
- [7] Rose N, Eveno E, Grasland B, et al. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: A hierarchical Bayesian survival analysis [J]. *Prev Vet Med*, 2009, 90(3/4): 168-79.
- [8] 刘建奎,杨小燕,魏春华,等. 猪细小病毒、猪圆环病毒 2 型和伪狂犬病病毒多重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(11): 1151-1155.
Liu J K, Yang X Y, Wei C H, et al. Development of a multiplex PCR assay for detection of porcine parvovirus, porcine circovirus type 2 and pseudorabies virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2010, 40(11): 1151-1155. (in Chinese)
- [9] Xie H L, Wang Z, Cui S J, et al. The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus [J]. *Virol J*, 2010, 7: 161.
- [10] Streck A F, Bonatto S L, Homeier T, et al. High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(11): 2628-2636.
- [11] Shangjin C, Cortey M, Segalés J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus [J]. *Virus Res*, 2009, 140(1/2): 209-215.
- [12] Wolf V H, Menossi M, Mourao G B, et al. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses [J]. *Genet Mol Res*, 2008, 7(2): 509-517.
- [13] Song C, Zhu C, Zhang C, et al. Detection of porcine parvovirus using a taqman-based real-time pcr with primers and probe designed for the NS1 gene [J]. *Virol J*, 2010, 7(1): 353.
- [14] Qing L, Lv J, Li H, et al. The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs [J]. *Vet Res Commun*, 2006, 30(2): 175-190.
- [15] 殷华平,郭万柱,徐志文,等. 猪细小病毒(PPV)SC1 株非结构蛋白 NS1 基因的克隆和序列分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(6): 504-508.
Yin H P, Guo W Z, Xu Z W, et al. The cloning and sequence analysis of NS1 gene of porcine parvovirus (PPV-SC1) [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 27(6): 504-508. (in Chinese)
- [16] Heegaard E D, Rasksen C J, Christensen J. Detection of parvovirus B19 NS1-specific antibodies by ELISA and western blotting employing recombinant NS1 protein as antigen [J]. *J Med Virol*, 2002, 67(3): 375-383.
- [17] 苏乾莲,李 斌,赵 武,等. 猪细小病毒自然弱毒 N 株非结构蛋白 NS1 基因原核表达 [J]. *广西农业科学*, 2010, 41(7): 710-713.
Su Q L, Li B, Zhao W, et al. Expression of non-structural protein NS1 gene in porcineparvovirus (PPV-N) strain [J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, 41(7): 710-713. (in Chinese)
- [18] 冉旭华,闻晓波,孟 凡,等. 猪细小病毒 NS1 蛋白主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(8): 964-967.
Yang X H, Wen X B, Meng F, et al. Establishment of an indirect ELISA with the major epitope domain of NS1 of PPV expressed in prokaryotical expression system [J]. *Chin J Vet Sci*, 2009, 29(8): 964-967. (in Chinese)