

网络出版时间:2017-08-21 13:50

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.10.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170821.1350.006.html>

PRRSV N 与 GP5 蛋白抗原表位的串联表达及其间接 ELISA 检测方法的建立

陈如敬,周伦江,吴学敏,车勇良,王晨燕,王隆柏,
黄晓凤,严 山,刘玉涛,魏 宏

(福建省农业科学院 畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心,福建 福州 350013)

【摘 要】 【目的】建立基于 N 与 GP5 蛋白抗原表位串联的猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)抗体 ELISA 检测方法,为开发准确、廉价的 PRRSV 抗体检测试剂盒奠定基础。【方法】将 PRRSV 的 N 蛋白和 GP5 蛋白抗原表位串联优化后进行原核表达,以表达的目的蛋白为抗原,通过优化反应条件建立检测 PRRSV 抗体的 ELISA 方法,对其特异性、重复性进行检测。用建立的间接 ELISA 方法和商品化 IDEXX 试剂盒同时对临床送检的 45 份猪血清样品进行检测,计算其符合率。【结果】SDS-PAGE 和 Western Blot 分析表明,表达的目的蛋白分子质量约为 24.7 ku,具有良好的生物学活性,且为可溶性表达。目的蛋白经纯化后作为抗原包被 ELISA 平板,建立检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 方法,优化后的 ELISA 条件为:抗原(纯化后的目的蛋白)包被量为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、一抗(猪血清)1:80 稀释、酶标二抗 1:5 000 稀释,以含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,抗体(一抗和酶标二抗)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min, TMB 避光显色 8 min;间接 ELISA 的判定标准为: $\text{OD}_{450} \geq 0.345$ 为阳性, $\text{OD}_{450} < 0.345$ 为阴性。所建立的间接 ELISA 方法特异性强,对猪常见病原,如猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒 2 型、猪瘟病毒和猪流行性乙型脑炎病毒高免血清检测均为阴性;重复性好,组内变异系数和组间变异系数分别为 1.02%~3.94% 和 1.38%~4.83%。用所建立的间接 ELISA 方法对临床送检 45 份猪血清样品的检测阳性率为 84.44%(38/45),商品化 IDEXX 试剂盒检测的阳性率为 80%(36/45),2 种方法的符合率为 94.73%(36/38)。【结论】成功建立了基于 N 与 GP5 蛋白抗原表位串联的 PRRSV 抗体 ELISA 检测方法。

【关键词】猪繁殖与呼吸综合征病毒;N 蛋白;GP5 蛋白;抗原表位;串联表达;间接 ELISA

【中图分类号】S858.28

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2017)10-0015-06

Establishment of an indirect enzyme-linked immuno-sorbent assay for detecting PRRSV serum antibody based on tandem expression with antigen epitopes of GP5 and N proteins

CHEN Rujing, ZHOU Lunjiang, WU Xuemin, CHE Yongliang, WANG Chenyan,
WANG Longbai, HUANG Xiaofeng, YAN Shan, LIU Yutao, WEI Hong

(Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center/Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 This study established an indirect enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) to detect the serum antibody levels of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) based on tandem expression with the antigen epitopes of GP5 and N proteins to provide basis for

【收稿日期】 2016-08-16

【基金项目】 福建省属公益类项目(2014R1023-16;2014R1023-13);福建省畜禽疫病防控技术重大研发平台项目(2014N2003)

【作者简介】 陈如敬(1984—),男,福建连江人,助理研究员,硕士,主要从事动物传染病研究。E-mail: fjcchenrujing@163.com

【通信作者】 周伦江(1973—),男,福建周宁人,研究员,博士,主要从事动物传染病研究。E-mail: lunjiang@163.com

developing accurate and inexpensive PRRSV serological test kits. 【Method】 After the prokaryotic tandem expression of N and GP5 proteins antigen epitopes of PRRSV, the expressed proteins were purified for use as coating antigen to determine the best indirect ELISA conditions. Then its specificity and repeatability were detected. Forty-five clinical serum samples were tested by the established ELISA and the coincidence rate was calculated by comparing with commercial IDEXX kit. 【Result】 SDS-PAGE and Western Blot analysis showed the weight of the recombinant soluble protein was 24.7 ku with good biological activity. The target proteins were purified and used as coating antigen to establish an indirect ELISA with following optimal conditions: coating concentration of purified proteins was 5 $\mu\text{g/mL}$, the serum was diluted by 1 : 80, the enzyme labeled antibody was diluted by 1 : 5 000, using 50 g/L skim milk powder in PBST as sealing fluid for 60 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, antibody (the serum and enzyme labeled antibody) were incubated for 90 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the reaction time of substrate was 8 min protected from light. The cut-off value of the assay was 0.345 2, with $\text{OD}_{450} \geq 0.345 2$ for positive and $\text{OD}_{450} < 0.345 2$ for negative. No cross-reactivity was observed with common porcine viruses' hyper immune serum, such as pseudorabies virus, porcine circovirus type 2, classic swine fever virus and porcine Japanese encephalitis virus. Reproducibility test showed that the intra- and inter-assay were 1.02%—3.94% and 1.38%—4.83%, respectively. Forty-five clinical serum samples were tested by the established ELISA and the commercial IDEXX kit and their positive rates were 84.44%(38/45) and 80%(36/45), respectively. The IDEXX kit positive samples were tested positive by the established indirect ELISA, with the coincidence rate of 94.73%(36/38). 【Conclusion】 The ELISA method for detecting serum antibody levels of PRRSV based on tandem expression with antigen epitopes of GP5 and N proteins was successful established.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; N proteins; GP5 proteins; antigen epitopes; tandem expression; indirect ELISA

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)属于网巢病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arteriviridae)动脉炎病毒属(*Arterivirus*)单股正链 RNA 病毒^[1-2]。PRRSV 的基因组长约 15 kb, 编码产物分别为(5'端至 3'端)非结构蛋白 ORF1(ORF1a 和 ORF1b)及结构蛋白 ORF2a(GP2a)、ORF2b(GP2b)、ORF3(GP3)、ORF4(GP4)、ORF5(GP5)、ORF6(M)和 ORF7(N)。PRRSV 基因组结构和其他动脉炎病毒组基因组结构相似, 在病毒的 5'端有帽子结构, 3'端多聚腺苷酸化^[3-5]。其非结构蛋白编码基因 ORF1 占基因组全长的 75%左右, 包含有 PRRSV 复制所需的酶类, 参与病毒的增殖过程。PRRSV 结构蛋白中 ORF2~ORF6 编码病毒的囊膜蛋白, 其中 ORF2~ORF5 编码的蛋白均为糖基化蛋白, 而 ORF6 编码的 M 蛋白为非糖基化蛋白; ORF7 编码病毒的核衣壳蛋白(N), 有较强的免疫原性^[6]。此外, 近年还发现在 ORF4 和 ORF5 之间存在一个新的 ORF5a 编码区, 编码 GP5a 蛋白^[7]。

目前, PRRSV 血清学抗体的检测主要使用 ELISA 方法, 包被的抗原主要是全病毒或 N 蛋白、

GP5 蛋白等 PRRSV 的高免疫原性蛋白。但是, 以全病毒作为诊断抗原存在散毒风险, 且病毒的大量增殖和纯化过程中所需工艺较为复杂^[8]。N 蛋白在感染细胞中表达水平较高, 保守性强, 具有群特异性, 被广泛用于 PRRSV 抗体的血清学诊断, 但是其检测的 PRRSV 抗体无法反映机体的免疫状态, 不适合用于对疫苗免疫效果的监测^[9]。GP5 蛋白是 PRRSV 最重要的免疫原性蛋白, 含有病毒中和作用和免疫保护相关的抗原表位, 且 PRRSV 感染后康复猪血清中的中和抗体主要针对 GP5^[10-11]。本研究针对当前 PRRSV 血清学检测中存在的不足^[12-14], 将 N 蛋白和 GP5 蛋白抗原性表位串联后进行优化, 将优化后的基因序列克隆到原核表达载体上进行表达并对表达条件进行优化, 然后纯化后的目的蛋白为抗原包被 ELISA 平板, 建立检测 PRRSV 抗体的血清学方法, 以期开发准确、廉价的 PRRSV 血清学检测试剂盒奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂与血清

SDS-PAGE 电泳相关试剂、ELISA 封闭用脱脂

奶粉、滤纸、转膜缓冲液、PBST,均购自碧云天生物技术有限公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I、T4 DNA 连接酶、DL 2000 DNA Marker、常规蛋白质标准和预染蛋白质标准,均购自宝生物工程(大连)有限公司;显色试剂(TrueBlue Peroxidase Substrate),购自西宝生物科技(上海)股份有限公司;His 蛋白纯化试剂盒,购自 Clontech;ELISA 平板,购自 Costar;HRP 标记的山羊抗猪酶标二抗,购自 Abcam;ELISA 显色液(TMB),购自武汉博士德生物工程有限公司;PVDF 膜、pET-32a 载体,购自默克密理博(Merck Millipore);克隆用大肠杆菌感受态细胞 Trans DH5 α 和表达用大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),均购自北京全式金生物技术有限公司;胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒,购自 Omega;商品化 PRRSV 抗体检测试剂盒,购自 IDEXX。

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪瘟病毒(CSFV)和猪流行性乙型脑炎病毒(JEV)高免血清,均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所猪病研究室制备并保存。

1.2 目的蛋白的原核表达与鉴定

1.2.1 抗原表位选择 分别选取针对 N 蛋白的抗原表位^[50]PEKPHFPLATEDDVRHHFTPS^[70]^[15-16]和针对 GP5 的抗原表位^[195]TRVSAEQWGRL^[200]^[17-18],将选取的抗原表位串联后进行表达优化,优化后的序列(119 bp)为 5'-GGATCC-CCGGAGAAGC-CGCATTTCCCCTGGCGACTGAAGATGACG-TCCGTCATCACTTTACCCCGAGTACCCGTG-TTTCAGCGGAACAATGGGGTCGTCTCTGA-GCGGCCGC-3',序列 5'和 3'末端分别引入 *Bam*HI 和 *Not* I 酶切位点(方框内序列),并在 3'端酶切位点前引入终止密码子 TGA(序列中黑体部分)。将优化后的序列送由宝生物工程(大连)有限公司进行基因合成,然后克隆到 pUC18 质粒上获得载体质粒 pUC18-N-GP5。

1.2.2 原核表达质粒 pET32-N-GP5 的构建 将串联后的质粒 pUC18-N-GP5 和 pET-32a 空载体分别进行 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,切胶回收目的片段。将回收的目的片段经 T4 DNA 连接酶连接过夜后,转化大肠杆菌感受态细胞 Trans DH5 α ,涂布氨苄青霉素(质量浓度 50 μ g/mL)抗性的 LB 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培

养 14 h 后,随机挑取 8 个单菌落于氨苄青霉素(质量浓度 50 μ g/mL)抗性的 LB 液体培养基,220 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h,小量提取质粒后进行 *Bam* HI 和 *Not* I 双酶切鉴定,筛选出阳性重组质粒 pET32-N-GP5。试验同时设 pET-32a 空载体对照。

1.2.3 阳性重组质粒 pET32-N-GP5 的原核表达

将阳性重组质粒 pET32-N-GP5 转化大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),涂布氨苄青霉素(质量浓度 50 μ g/mL)抗性的 LB 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后,随机挑取 8 个单菌落于氨苄青霉素(质量浓度 50 μ g/mL)抗性的 LB 液体培养基,220 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h,进行菌液 PCR 鉴定,筛选出原核表达阳性菌培养液。将阳性菌培养液按照体积分数 1% 转接 10 mL LB 液体培养基,220 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h 至对数生长期,加入不同终浓度(0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mmol/L)的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 诱导表达不同时间(诱导时间分别为 2, 3, 4, 5 和 6 h)后,取 2 mL 菌液经 10 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体重悬于 100 μ L PBS,冰水浴超声 5 min(超声功率为 200 W,工作 2 s,间歇 5 s),10 000 r/min 离心 10 min,分别取菌体液及离心后上清液和沉淀备用。

1.2.4 SDS-PAGE 分析和 Western Blot 鉴定 取上述菌体液及离心后的上清液和沉淀各 8 μ L,分别加入 2 μ L 4 $\times$ SDS Loading Buffer,95 $^{\circ}$ C 加热 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 15%),试验同时设 pET-32a 空载体对照。剪取滤纸(和 SDS-PAGE 胶大小)8 张和 PVDF 膜(比 SDS-PAGE 胶稍大),使用转膜缓冲液处理后,按滤纸(4 张)、PVDF 膜、凝胶、滤纸(4 张)的顺序依次放在转膜仪电极板之间,开始转膜(55 mA 恒流转膜 80 min)。将 PVDF 膜置于含 50 g/L 脱脂奶粉的封闭液中,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,取出后用 1:25 倍稀释的 PRRSV 高免血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min,洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗猪酶标二抗(1:500 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min,洗涤后使用 Western Blot 显色试剂盒(TrueBlue Peroxidase Substrate)显色 2 min。

1.3 N 与 GP5 串联抗原表位蛋白的纯化

将符合预期的蛋白大量表达后收获菌体液,按照 His 蛋白纯化试剂盒(His-Tagged Purification Miniprep Kit)说明书进行纯化,前期经 SDS-PAGE 鉴定为可溶表达的蛋白取超声离心后上清液(约 50 mL)进行纯化,洗脱后得到目的蛋白约 200 μ L,利用 SDS-PAGE 电泳对纯化效果进行鉴定,并测定纯化后蛋白的浓度。

1.4 PRRSV 间接 ELISA 检测方法的建立与应用

1.4.1 ELISA 条件优化 利用矩阵滴定试验优化间接 ELISA 条件,包被抗原质量浓度分别设为 1.25,2.5,5.0,7.5,10.0 和 15.0 $\mu\text{g/mL}$;一抗(猪血清)稀释度 1:20,1:40,1:80,1:160 和 1:320;酶标二抗(HRP 标记的山羊抗猪)稀释度按照试剂盒说明设定为 1:5 000;反应时间分别设为 30,60,90 和 120 min;显色时间分别设为 4,6,8,10 和 12 min;确定 ELISA 最优工作条件。

1.4.2 临界值的判定 取经 IDEXX 商品化试剂盒检测为阴性的猪血清 30 份,利用本研究建立的间接 ELISA 方法进行检测,计算 30 份猪阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均数($\bar{X}$)和标准方差(SD)。本研究将 $\bar{X}+3SD$ 设定为临界值(C),当待测血清 OD₄₅₀ 值 $\geq$ 临界值(C)判定为 PRRSV 阳性;待测血清 OD₄₅₀ 值 $<$ 临界值(C)均判定为阴性。

1.4.3 特异性检测 利用优化后的条件,对猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪瘟病毒(CSFV)和猪流行性乙型脑炎病毒(JEV)阳性血清进行 OD₄₅₀ 值检测,并设定猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)阳性高免血清和阴性血清为对照,评价建立的间接 ELISA 方法的特异性。

1.4.4 重复性试验 用同一批次的 ELISA 平板,

对 PRRSV 阳性高免血清和阴性血清进行检测,每份样品重复检测 5 次,计算组内重复系数;将同一批次平板分别放置 1,2,3,4 和 5 周后,对同一 PRRSV 阳性高免血清和阴性血清进行检测,计算组间重复系数。

1.4.5 临床应用与对比 用建立的间接 ELISA 方法,对临床送检的 45 份猪血清进行检测;同时使用商品化 IDEXX 试剂盒对 45 份血清样品进行平行测定,计算两者之间的符合率。

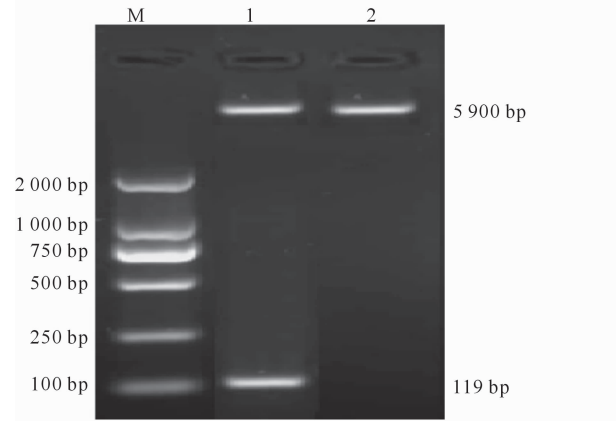
2 结果与分析

2.1 原核表达质粒 pET32-N-GP5 的鉴定

阳性重组质粒 pET32-N-GP5 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后可,获得长度约为 5 900 和 119 bp 的 2 条片段,而 pET-32a 空载体经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后仅获得长度约为 5 900 bp 的片段(图 1)。

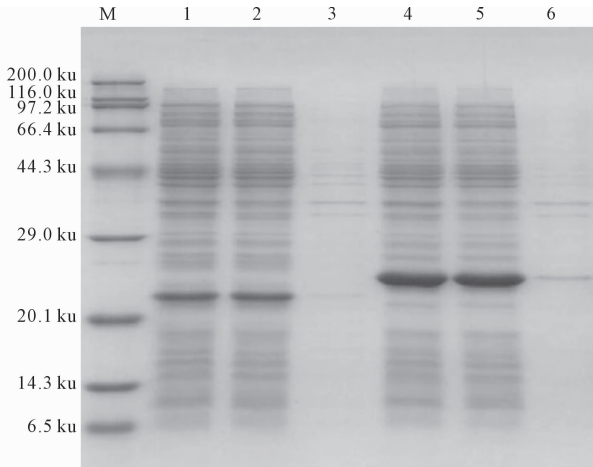
2.2 目的蛋白的表达、鉴定与纯化

对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 分析,结果表明优化后的表达条件为 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 即可获得高效表达。对超声后的菌体液及离心后的上清液和沉淀的分析表明,串联 N 和 GP5 蛋白抗原表位表达的目的蛋白基本为可溶性表达,分子质量约为 24.7 ku(图 2)。



M. DL 2000 DNA Marker;1. 重组质粒 pET32-N-GP5 双酶切产物;2. pET-32a 空载体双酶切产物
M. DNA DL 2000 Marker;1. Recombinant plasmids pET32-N-GP5 digested by *Bam*H I and *Not* I;2. pET-32a blank vector plasmids digested by *Bam*H I and *Not* I

图 1 原核表达质粒 pET32-N-GP5 的 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切鉴定
Fig.1 Double digestion identification of the recombinant plasmid pET32-N-GP5

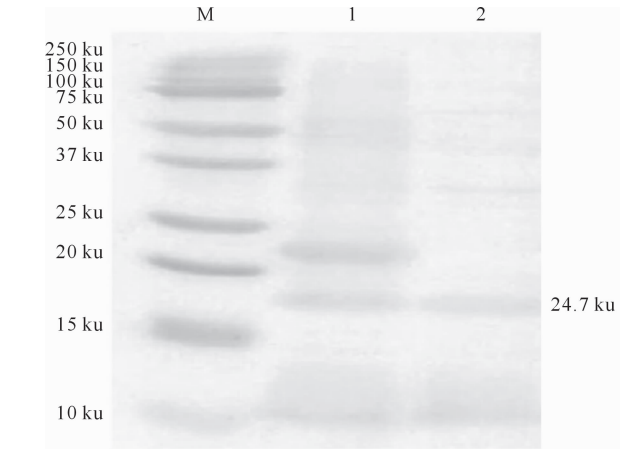


M. 蛋白质 Marker;1. pET-32a 空载体(全细胞对照);2. pET-32a 空载体(上清对照);3. pET-32a 空载体(沉淀对照);4. 目的蛋白(全细胞);5. 目的蛋白(上清);6. 目的蛋白(沉淀)
M. Protein Marker;1. pET-32a vector control (Cell control);2. pET-32a vector control (Supernatant control);3. pET-32a vector control (Precipitate control);4. Target protein (Cell);5. Target protein (Supernatant);6. Target protein (Precipitate)

图 2 PRRSV N 与 GP5 蛋白串联抗原表位目的蛋白的 SDS-PAGE 鉴定
Fig.2 SDS-PAGE analysis for tandem expression with antigen epitopes of PRRSV GP5 and N proteins

将目的蛋白转膜后进行 Western Blot 鉴定,可见串联表位表达的目的蛋白可与 PRRSV 高免血清发生特异性反应(图 3)。将目的蛋白按照 His 蛋白纯化试剂盒(His-Tagged Purification Miniprep Kit)纯

化后进行 SDS-PAGE,结果获得了 24.7 ku 的特异性蛋白条带(图 4),经测定纯化后的蛋白质量浓度约为 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



M. 蛋白预染 Marker;1. 目的蛋白;2. pET-32a 空载体
M. Stained protein Marker;1. Target protein;2. pET-32a vector
图 3 PRRSV N 与 GP5 蛋白串联抗原表位目的蛋白的 Western Blot 鉴定

Fig. 3 Western Blot analysis for tandem expression with antigen epitopes of PRRSV GP5 and N proteins

2.3 PRRSV 间接 ELISA 检测条件的优化

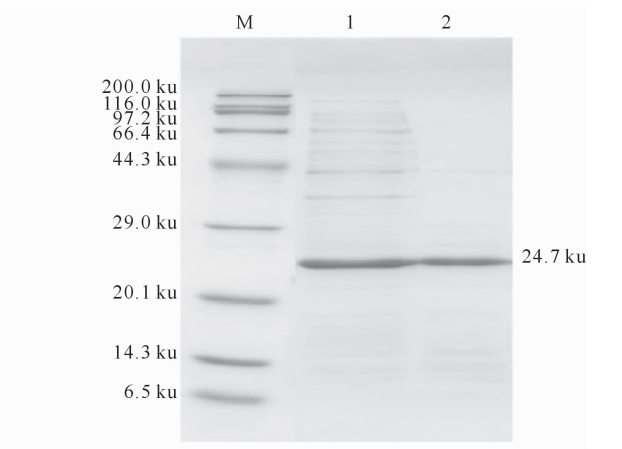
经优化后的间接 ELISA 条件为:包被抗原(纯化后的目的蛋白)5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、血清稀释度为 1 : 80、酶标二抗稀释度 1 : 5 000;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min,避光显色 8 min。对 30 份猪血清样品进行检测后,经计算得到 OD_{450} 的平均数 $\bar{X}=0.233\ 6$,标准方差(SD)=0.037 2,得到本研究的临界值(C)为 0.345 2,即用建立的 ELISA 对临床样品进行检测时 $\text{OD}_{450} \geq 0.345\ 2$ 为阳性, $\text{OD}_{450} < 0.345\ 2$ 为阴性。

2.4 PRRSV 间接 ELISA 检测方法的特异性和重复性

利用优化后的条件,对 PRV、PCV2、CSFV 和 JEV 阳性血清进行检测, OD_{450} 值分别为 0.243, 0.219, 0.231 和 0.227,均在 0.345 2 以内,而 PRRSV 阳性血清的 OD_{450} 值为 1.173,阴性血清的 OD_{450} 值为 0.186,表明本研究建立的 PRRSV 间接 ELISA 检测方法特异性强,与常见猪群传染病病原高免血清均无交叉反应;重复性试验表明,所建立的间接 ELISA 方法组内变异系数为 1.02% ~ 3.94%,组间变异系数为 1.38% ~ 4.83%,表明该 PRRSV 间接 ELISA 检测方法重复性良好。

2.5 PRRSV 间接 ELISA 检测方法的临床应用

利用建立的 ELISA 方法对临床送检的 45 份猪



M. 蛋白质 Marker;1. 纯化前的目的蛋白;2. 纯化后的目的蛋白
M. Protein Marker;1. Target protein before purified;2. Target protein after purified

图 4 PRRSV N 与 GP5 蛋白串联抗原表位目的蛋白的纯化
Fig. 4 Purification for tandem expression with antigen epitopes of PRRSV GP5 and N proteins

血清进行检测,结果检出阳性样品 38 份,阳性率为 84.44%(38/45);使用商品化 IDEXX 试剂盒测得阳性样品 36 份,阳性率为 80%(36/45)。对利用所建立 ELISA 方法检测为阳性的 38 份样品再用 IDEXX 试剂盒进行检测,其中有 36 份呈阳性,因此 2 种方法的符合率为 94.73%(36/38)。

3 讨 论

猪群感染 PRRSV 后,猪体内早期主要产生针对 N 蛋白的抗体。GP5 蛋白是 PRRSV 最重要的免疫原性蛋白,参与中和抗体的产生,PRRSV 感染后康复猪血清中的中和抗体主要针对 GP5 蛋白^[19-23]。PRRSV 抗体水平是猪群抵抗 PRRSV 感染的一个重要的指标,目前已有多种 PRRSV 抗体的检测方法,如免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、间接荧光抗体试验(IFA)、血清中和试验(SN)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、乳胶凝集试验和胶体金试纸条等,但使用最广泛的还是 ELISA 试剂盒,其中主要是 IDEXX 试剂盒(以 N 蛋白为包被抗原)和 LSI 试剂盒(以 GP5 蛋白为包被抗原),但检测成本较高。

抗原表位(Antigen epitope)又称抗原决定簇(Antigenic determination),是指抗原分子表面具有

刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能被其识别的免疫活性区^[24-26]。本研究根据前期研究鉴定的针对 N 蛋白和 GP5 蛋白的抗原表位,选取保守性强的表位进行串联表达,经条件优化后获得具有良好生物学活性的分泌型串联表位重组蛋白,分子质量约为 24.7 ku。所获得的分泌型串联表达蛋白结构简单,易于纯化,避免了与其他病毒细菌抗体发生交叉反应的可能性,且分泌的蛋白为水溶性蛋白,作为 ELISA 包被抗原操作简便。

以纯化后的蛋白为包被抗原建立检测 PRRSV 抗体的血清学方法,优化后的条件为:包被抗原(纯化后的目的蛋白)5 $\mu\text{g/mL}$ 、血清稀释度为 1:80、酶标二抗浓度 1:5 000;建立的间接 ELISA 方法的临界值为 0.345 2,且和其他常见猪群病原高免血清无交叉反应,变异系数低。对临床样品的检测发现,本研究所建立的 ELISA 方法检测的结果与商品化 IDEXX 试剂盒的符合率为 94.73%,且本方法所建立的 ELISA 试剂盒成本低廉,样本符合率较高,为开发准确、廉价的 PRRSV 血清学检测试剂盒奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Done S H, Paton D J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression [J]. *Vet Rec*, 1995, 136(2): 32-35.
- [2] 朱小甫, 吴旭锦. PRRSV 经典株和变异株 RT-nPCR 鉴别诊断方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(1): 25-30.
Zhu X F, Wu X J. Establishment of a RT-nPCR diagnostic method for PRRSV classical and variant strains [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(1): 25-30.
- [3] Dea S, Gagnon C A, 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]. *Arch Virol*, 2000, 145(4): 659-688.
- [4] 张冲, 武小椿, 王波. 野猪源与家猪源 PRRSV 陕西分离株全基因组测序与遗传进化分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(2): 9-16.
Zhang C, Wu X C, Wang B. Genomic sequencing and phylogenetic analysis of PRRSV isolated from domestic pig and wild boar in Shaanxi Province [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(2): 9-16.
- [5] 王凤雪, 郭利, 温永俊. 吉林地区高致病性 PRRSV JL-04/12 株的分离鉴定与全基因组测序 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(4): 37-44.
Wang F X, Guo L, Wen Y J. Isolation, identification and sequencing of PRRSV JL-04/12 strain with high pathogenicity from Jilin, China [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2013, 41(4): 37-44.
- [6] Han M, Yoo D. Engineering the PRRS virus genome: updates and perspectives [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 174(3/4): 279-295.
- [7] Wei C, Huang Z, Sun L, et al. Expression and antibody preparation of GP5a gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Indian J Microbiol*, 2013, 53(3): 370-375.
- [8] 蔡雪晖, 郭宝清, 柴文君, 等. 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体 ELISA 方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(2): 122-125.
Cai X H, Guo B Q, Cai W J, et al. An indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22(2): 122-125.
- [9] Denac H, Moser C, Tratschin J D, et al. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen [J]. *J Virol Methods*, 1997, 65(2): 169-181.
- [10] Plagemann P G. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain [J]. *Viral Immunology*, 2006, 19(2): 285-293.
- [11] Pyo H, Seo J, Suh G, et al. Serodiagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection with the use of glycoprotein 5 antigens [J]. *Can J Vet Res*, 2010, 74(3): 223-227.
- [12] Nodelijk G. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis [J]. *Vet Q*, 2002, 24(2): 95-100.
- [13] 苗立中, 沈志强. 猪繁殖与呼吸综合征病毒诊断方法的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(10): 206-210.
Miao L Z, Shen Z Q. Progress of diagnostic methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 29(10): 206-210.
- [14] 朱佳毅, 任晓峰. 猪繁殖与呼吸综合征病毒检测方法的研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(1): 77-80.
Zhu J Y, Ren X F. Progress on detection technique of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(1): 77-80.
- [15] Wiczorek-Krohmer M, Weiland F, Conzelmann K, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U. S. isolates [J]. *Vet Microbiol*, 1996, 51(3/4): 257-266.
- [16] Zhou Y J, An T Q, Liu J X, et al. Identification of a conserved epitope cluster in the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Viral Immunol*, 2006, 19(3): 383-390.

肉鸡舍空气微生物的影响 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4344-4353.

Tong Y J, Sa R N, Zhang H F, et al. Comparative studies on the bacteriostatic activity of three *Bacillus strains* and its effects on air microorganisms [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(20): 4344-4353.

[23] 孙春阳. 复合芽孢杆菌喷剂对鸡舍环境及肉鸡呼吸道菌群结构的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

Sun C Y. Effect of the composite *Bacillus* sprays on the environment of the house and respiratory tract microflora of broilers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2013.

[24] 高 敏, 贾瑞志, 仇天雷, 等. 集约化养鸡场空气环境中生物气溶胶特点研究 [J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4): 787-794.

Gao M, Jia R Z, Qiu T L, et al. Characteristics of bioaerosols in air environment of confined poultry feeding operations [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(4): 787-794.

[25] 段会勇. 动物舍微生物气溶胶及其向周围环境的传播 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2008.

Duan H Y. Microbiological aerosol of animal houses and their transmission to the surroundings [D]. Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 2008.

[26] 柴同杰, 赵云玲, 刘 辉, 等. 禽舍微生物气溶胶含量及其空气动力学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(3): 9-11.

Chai T J, Zhao Y L, Liu H, et al. Studies on the concentration and aerodynamic diameters of microbiological aerosol in the poultry house [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2001, 37(3): 9-11.

[27] Hu D, Wang-Li L J, Simmons III O D, et al. Size distributions of bioaerosols in an egg production facility and its vicinity [J]. *Environmental Engineering Science*, 2016, 33(4): 215-223.

[28] 袁 文, 柴同杰, 苗增民, 等. 猪舍环境气载需氧菌含量的季节性变化及其健康风险评估 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(5): 51-55.

Yuan W, Chai T J, Miao Z M, et al. The seasonal changes and health risk assessment of airborne aerobic bacteria concentration in closed pig house [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(5): 51-55.

(上接第 20 页)

[17] Ostrowski M, Galeota J A, Jar A M, et al. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4241-4250.

[18] Zhou Y J, Yu H, Tian Z J, et al. Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus of GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 138(1/2): 1-10.

[19] 张松林, 韩 静, 李 峰, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的免疫学和免疫逃避研究进展 [J]. 病毒学报, 2012, 28(6): 689-698.

Zhang S L, Han J, Li F, et al. Advance in immunology and immune evasion of PRRSV [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(6): 689-698.

[20] Rascón-Castelo E, Burgara-Estrella A, Mateu E, et al. Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Viruses*, 2015, 7(3): 873-886.

[21] Loving C L, Osorio F A, Murtaugh M P, et al. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 167(1/2): 1-14.

[22] 刘 杏, 王风雪, 温永俊. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染和复制机制及其毒力研究进展 [J]. 病毒学报, 2015, 31(5): 585-592.

Liu X, Wang F X, Wen Y J, et al. Advances in understanding of the infection/replication mechanisms and virulence determinants of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(5): 585-592.

[23] Serão N V, Kemp R A, Mote B E, et al. Genetic and genomic basis of antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in gilts and sows [J]. *Genet Sel Evol*, 2016, 48(1): 51.

[24] Chen P, Rayner S, Hu K. Advances of bioinformatics tools applied in virus epitopes prediction [J]. *Virol Sin*, 2011, 26(1): 1-7.

[25] 郭春艳, 赵向绒, 胡 军. B 细胞抗原表位的研究进展及其应用 [J]. 生物技术通讯, 2012, 24(2): 266-270.

Guo C Y, Zhao X R, Hu J. Research and application of B cell epitope [J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 24(2): 266-270.

[26] He L, Zhu J. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation [J]. *Curr Opin Virol*, 2015, 11: 103-112.