

## 检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的重组 N 蛋白-ELISA 的建立\*

许立华<sup>1, 2</sup>, 苏鑫铭<sup>1</sup>, 王玲<sup>2</sup>, 王志亮<sup>3</sup>, 吴延功<sup>3</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>

(1. 南京农业大学农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 宁夏大学农学院动物科学系, 宁夏银川 750021; 3. 农业部动物检疫所, 山东青岛 266032)

### Establishment of Recombinant N Protein Based ELISA for Detection of Antibody Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

XU Li-hua<sup>1, 2</sup>, SU Xin-ming<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>2</sup>, WANG Zhi-liang<sup>3</sup>, WU Yan-gong<sup>3</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Department of Animal Science, Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. Animal Quarantine Institute of Agriculture Ministry, Qingdao 266032, China)

**Abstract:** The recombinant plasmid pETN was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) host cell and the expression product-recombinant nucleocapsid protein of PRRSV was obtained under the optimized condition of host cell cultivation and IPTG induction. Consequently, the expression product was purified by means of his-binding resin protein purification procedure. SDS-PAGE and Western-blot were used to detect the purification effect and the specificity of purified recombinant nucleocapsid protein of PRRSV. The purified N protein was used to coat 96-well plate, each step was optimized, such as coating concentration of recombinant nucleocapsid protein, sample dilution, chromogen (TMB) and stop solution as well as concentration. As a result, an indirect ELISA was established to detect antibody against PRRSV. About 200 serum samples were detected by the method and IDEXX ELISA kit, respectively. The agreement ratio between the two methods reached at 91%.

**Key words:** Recombinant plasmid; Recombinant nucleocapsid protein; Antibody against *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*; Indirect ELISA

**摘要:** 将已构建成功的重组质粒 pETN 转化入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 在最佳诱导条件下获得重组 N 蛋白。随后用 His-Bind 对表达产物进行纯化, 对纯化效果及纯化产物的特异性分别用 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 试验检测。在此基础上, 以纯化的重组 N 蛋白作为包被抗原, 对各种条件进行优化 (如抗原的包被, 作用时间及底物的选择), 确定了判定标准, 建立了检测 PRRS 抗体的间接 ELISA 方法。用此方法检测了 200 份血清样品, 并与 IDEXX 公司 ELISA 试剂盒检测结果相比较, 符合率达 91%。

**关键词:** 重组质粒; 重组 N 蛋白; 猪繁殖与呼吸综合征抗体; 间接 ELISA

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152 (2004) 03-0250-05

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS) 是一种上世纪八十年代发现的传染病, 主要引起妊娠母猪的流产、早产、死胎及仔猪表现出咳嗽、呼吸困难等呼吸道症

状。本病自 1987 年首次在美国发现至今, 已广泛分布于世界大多数养猪国家和地区, 对养猪业构成严重威胁, 并已造成巨大损失。目前, 国际兽疫防治局 (OIE) 已将本病列为 B 类传染病, 我国也将

收稿日期: 2003-11-18, 修回日期: 2003-12-29

\* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划资助项目 (2001AA249012)

作者简介: 许立华 (1972-), 男, 宁夏永宁籍, 硕士, 讲师, 主要从事动物分子病毒学与疫病诊断方法的研究。

\*\* 通讯作者: 陈溥言 (1941-), 男, 江苏南京籍, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子病毒学与免疫学的研究。

Corresponding author. Tel: 025-4396028, E-mail: and@njau.edu.cn 或 lihuaxu1972@sohu.com

其列为二类传染病。

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 的病原体是猪繁殖与呼吸综合征病毒 (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*; PRRSV), 于 1991 年由荷兰学者 Wensvoort 及其同事首次用原代猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 分离到一株欧洲型 PRRSV<sup>[1]</sup>, 并命名为 “Lelystad Virus”, 即 LV 株, 随后, 美国学者 Collins 等分离到 PRRSV ATCC VR2332 株<sup>[2]</sup>。根据病毒基因组核苷酸的不同, 将其分为两种基因型, 即以 PRRSV ATCC VR2332 为代表株的北美洲型和以 LV 为代表株的欧洲型。病毒基因组约 15kb, 含有 8 个阅读框 (ORFs), 其中 ORF1 编码病毒的 RNA 复制酶, ORF2—7 分别编码病毒的结构蛋白。在 PRRSV 的结构蛋白中以 ORF7 编码的病毒核衣壳蛋白最为保守, 而且其含量占病毒结构蛋白的 20%~40%, 已经证实该蛋白具有很强的免疫原性<sup>[3,4]</sup>。

我国台湾省于 1991 年暴发本病, 1996 年证实了本病在国内的流行<sup>[5,6]</sup>。根据近年来对本病的研究的深入进行, 表明在我国的东北、华北、华东、华南等地均有流行, 且在部分地区已造成重大损失, 对养猪业的健康发展构成严重威胁。当前我国正处于 PRRS 不断蔓延和流行面积逐步扩大的严峻形势, 如何使用有效、实用的手段对本病进行及时检测, 进而采取相应措施进行防制是本病研究的重点之一。

本试验在已构建的 PRRSV N 基因高效表达载体的基础上, 获得了表达产物—PRRSV 的重组核衣壳蛋白 (N 蛋白), 并对此融合蛋白进行纯化, 以此重组蛋白作为包被抗原初步建立了检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的间接 ELISA 方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

重组质粒 pETN 为笔者所构建<sup>[7]</sup>; 宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 为本组保存。

盐酸胍、咪唑、树脂、尿素购自南京生物工程有限公司; 兔抗猪酶标二抗为丹麦 DAKO 公司产品; 四甲基联苯胺 (TMB) 购自青岛海泰生物技术公司; ELISA 试验用 96 孔板条 (可拆式) 为丹麦 NUNC 公司产品; 蛋白质纯化试剂盒购自上海华美生物技术公司; IDEXX 公司 PRRS 抗体检测试剂盒购自上海罗曼生物技术公司; EPX—800 酶标检测仪购自上海基因公司; 超声波裂解仪为南京农业大学中心实验室提供。

PRRS 阴性、阳性血清为本室保存; 猪细小病

毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清、猪瘟阳性血清、猪布鲁氏菌病阳性血清均为本室保存。

从上海、江苏、安徽、山东、浙江等地采集或收集的猪血清 860 份。置于 -20℃ 保存备用。

### 1.2 融合 N 蛋白的纯化

将重组质粒 pETN 转化到 BL21 (DE3) 宿主菌, 按常规方法进行的操作<sup>[7]</sup>。

按前文<sup>[6]</sup>获得融合 N 蛋白的表达产物。

表达产物用蛋白质纯化试剂盒纯化, 按常规方法进行 Western-blot 试验。

### 1.3 间接 ELISA 方法的建立

按常规方法确定抗原最佳包被浓度与包被时间、封闭液及封闭条件、血清稀释液及血清作用时间、酶标二抗作用时间; 筛选底物与终止液; 确定底物作用的时间及温度。

取 200 份已知背景并经 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒检测过的猪血清样品, 按照上述优化的条件进行 ELISA 检测, 检测结果在计算机上用 Excell 软件进行分析, 确定 cut-off 值, 以此作为依据确定判定标准。

### 1.4 特异性试验

1.4.1 交叉试验: 在同一条件下对本实验室保存的 PRRS 阴性、阳性血清及猪细小病毒病阳性血清、猪圆环病毒病阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清、猪瘟阳性血清、猪布鲁氏菌病阳性血清进行 ELISA 检测, 每份血清重复检测 4 孔。通过 OD 值来判定阴阳性结果, 以此判定是否存在交叉反应。

1.4.2 与 PRRSV 单克隆抗体的反应: 使用农业部动物检疫所提供的 PRRSV 的三株单抗, 同时设立已知的 PRRS 阴、阳性血清作为对照, 每份样品重复检测 4 孔, 按笔者建立的 ELISA 方法进行检测, 通过 OD 值判定结果。

### 1.5 敏感性试验

取 200 份血清样品分别用本组建立的重组 N 蛋白—ELISA 方法与 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒进行检测, 根据结果统计二者的符合率。

### 1.6 重复性试验

用同一批制备的重组 N 蛋白包被板条, 取已知的 PRRS 阴和阳性血清各一份, 另取三份待检血清, 在其它条件不变的情况下, 应用本方法进行检测, 每份样品重复四孔, 根据 OD 值判定批内重复性; 取不同时间制备并纯化的重组 N 蛋白, 经包被、封闭后对已知的阴、阳性血清及另外三份待检血清进行检测, 每份血清检测 4 孔, 重复检测五次。根据

OD 值判定不同时间制备的抗原建立的 ELISA 的可重复性。

### 1.7 包被抗原保存期的确定

纯化蛋白以最佳工作浓度包被并经封闭后,用包装袋封好,置于 4℃ 保存,以后每隔 1 月取出用已知阴性血清按所建立的方法进行检测。共检测 6 次。

### 1.8 重组 N 蛋白—ELISA 检测技术的应用

将本室采集和收集的 860 份血清样品,采用本方法检测 PRRS 抗体,结合样品背景进行结果分析。有关数据的处理按“四舍五入”法。

## 2 结果

### 2.1 重组 N 蛋白的纯化和特异性检查

重组 N 蛋白的 SDS—PAGE 电泳结果见图 1A。由图 1A 观察到表达产物经纯化后,目标蛋白仍具有较高的浓度,尽管存在极少量的杂蛋白,但目标蛋白占有绝对多的含量,表明纯化效果达到预期的目的。

对纯化产物应用 Western-blot 试验进行检验,结果见图 1B。在目标条带所在位置出现一条明显的棕褐色印迹,未见到杂条带。证明该纯化产物具有良好的特异性,即反应原性。

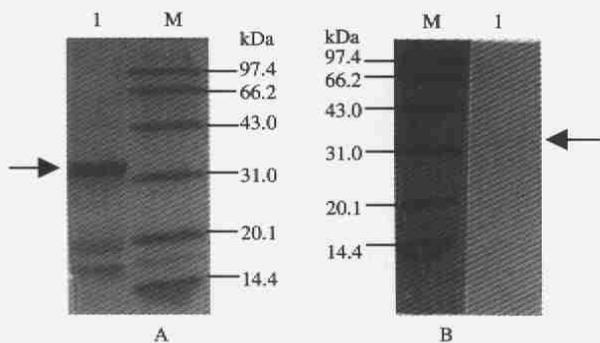


图 1 重组 N 蛋白的 SDS—PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测

Fig.1 Purified recombinant N protein in SDS-PAGE (A) and Western blotting (B);

M, Protein marker; 1, Purified recombinant N protein

### 2.2 ELISA 反应条件的确定

通过方阵滴定试验,确定抗原最佳包被浓度为 47 $\mu$ g/mL,而血清最佳稀释倍数为 1:40,为整个重组 N 蛋白-ELISA 检测方法的建立确定了良好的反应条件。抗原最佳包被时间的试验结果表明不论是在 37℃ 还是在室温放置一段时间再移入 4℃ 完成包被,对 ELISA 结果都不会有明显影响,提示最终移入 4℃ 过夜包被是保证良好包被效果的一个必需

环节。试验结果显示,温度对封闭效果的影响不显著,而封闭时间的长短对于检测结果却是明显的。通过结果可以看出,在 37℃ 封闭 3h 同封闭 1h、2h 的存在着显著差异,而同 4h 的差异不显著,同样,在 4℃ 下封闭的结果也存在这样的趋势。通过试验结果确定血清最佳作用时间为 37℃ 或室温下 45min,确定酶标二抗的作用条件为 37℃ 作用 20min 或在室温下作用 30min; 显色底物为四甲基联苯胺 (TMB),其作用时间确定为 37℃ 15min 或室温下 20min,终止液为低浓度的 HF。

### 2.3 判定标准的确定

将大量血清分别经 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒与重组 N 蛋白—ELISA 检测,以前者的测定结果为参考,按照本方法测得阴性血清 OD<sub>630</sub> 的均值范围 0.12 $\pm$ 0.03,在此基础上确定判定标准: S/N > 2.1 且阳性血清 OD<sub>630</sub> > 0.25,即可判为阳性。

### 2.4 特异性试验

采用重组 N 蛋白—ELISA 对几种猪繁殖障碍性疾病的阳性血清及已知的 PRRS 阴、阳性血清进行检测。结果是 PRRS 阳性血清为阳性,而猪细小病毒病阳性血清、猪圆环病毒病阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清、猪瘟阳性血清、猪布鲁氏菌病阳性血清及 PRRS 阴性血清均为阴性结果。说明应用本方法不发生交叉反应,具有良好的特异性;与 3 株单抗均发生阳性反应,从而证实了以重组 N 蛋白建立的间接 ELISA 的特异性。

### 2.5 敏感性试验

取 200 份收集的血清分别用重组 N 蛋白—ELISA、IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒进行检测,结果见表 1。按照常规方法得出比较结果,即阳性血清的阳性检出率为相对灵敏度,也就是笔者所建立的 Rn -ELISA 与 IDEXX ELISA 相比,敏感性达 92.7%。以两种方法检测结果均为阳性或均为阴性的血清样本总数占总检测样本的比例即为二者的符合率,由此得出两方法的符合率为 91% (69/76)。

表 1 重组 N 蛋白—ELISA、IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒的敏感性比较

Detection method	Positive	Negative
ELISA kit of IDEXX	84	116
Recombinant N protein based ELISA	78	122

### 2.6 重复性试验

批内重复试验结果显示批内重复试验的变异系数均值 (C.V%) 为 4.82%, 小于 7%, 表明该方

法具有良好的重复性;不同批次抗原的重复试验结果表明:不同批次抗原与同一份血清反应的 OD 值及 P/N 比影响不大,采用 t 检验,差异不显著 ( $P>0.05$ ),再次证明了本方法的良好重复性。

### 2.7 重组 N 蛋白包被板的保存期测定

测定结果见表 2,结果显示,保存一个月与六个月的反应板对同一份血清的 OD 值变化不大,差异不显著。此测试结果表明:用重组 N 蛋白包被的反应板至少存放六个月而不会对样品检测造成影响。提示保存期至少为六个月。

表 2 重组 N 蛋白包被板的保存期测定

Table 2 Test of storage life of recombinant nucleocapsid protein coated plates

Detected sample	Results of test (mean value)						Mean value $\bar{x}$
	1	2	3	4	5	6	
Positive serum	0.41	0.39	0.38	0.43	0.39	0.40	0.40
Negative serum	0.41	0.16	0.14	0.13	0.13	0.14	0.14
P/N value	2.93	2.43	2.71	3.31	3.00	2.85	2.87

### 2.8 重组 N 蛋白 ELISA 检测方法的应用

应用本方法对 860 份血清样品检测,检测结果显示各地送检血清的阳性检出率不同,检测样品的平均阳性率为 44.5%,但血清的阳性检出结果不能认定就是 PRRSV 感染所致,而应根据血清来源的猪场背景加以分析。这一结果反映出各地猪场的 ELISA 检测阳性较为普遍,出现这种情况一方面是疫苗应用的结果,而另一方面则提示感染了 PRRSV。

## 3 讨论

PRRS 自 1987 年首次发现至今,关于其诊断方法的研究及成果屡见不鲜,其中包括病毒的分离与鉴定、病毒抗原性检测、血清学方法及分子生物学检测方法。目前,应用最多的是针对 PRRSV 血清抗体进行检测的一些方法,如间接免疫荧光 (IFA)、免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA) 及多种酶联免疫吸附试验 (ELISA),其中 ELISA 是最为常用的方法<sup>[9-17]</sup>。尽管美国 IDEXX 公司研制的 PRRS 抗体检测的 ELISA 试剂盒在我国一些地区得到应用,但由于该试剂盒价格昂贵且只能在有条件的实验室或生产单位使用,从而限制了它的广泛使用。因此,寻求一种简便易行且具有较高特异性和敏感性的检测方法是多数学者努力的方向。

本试验在 PRRS 分子流行病学的基础上,应用 PRRSV 核衣壳蛋白 (N 蛋白) 在免疫学方面的功能

和作用,将其在原核表达载体上进行高效表达,以此建立了检测 PRRS 血清抗体的 ELISA 方法。编码 N 蛋白的核衣壳蛋白基因在两个基因型的 PRRSV 中都含有 5 个连续的构象依赖性抗原表位,这五个表位都相当保守。大量的研究结果表明 N 蛋白是 PRRSV 中含量最高且免疫原性最强的结构蛋白,猪体在遭受 PRRSV 感染或疫苗接种后,机体血清内首先出现的便是针对 N 蛋白的抗体且抗体水平也最高,这种高水平的抗体在体内至少可持续半年以上,因此具有极高的诊断意义。所以国内外的研究人员大多利用 N 蛋白的上述特性,用以研究 PRRS 血清抗体的检测方法。

在本研究中,将已构建的重组载体转入表达宿主 BL21 (DE3) 中,采用已确定的最佳培养及诱导条件,实现了对 PRRSV N 蛋白的高效表达。对此重组表达产物进行纯化,获得了高浓度的重组 N 蛋白,为表达产物的纯化提供了新思路和新途径。最终以此纯化产物作为包被抗原初步建立了重组 N 蛋白-ELISA 方法。

本研究对重组 N 蛋白-ELISA 的条件进行优化,确定了重组 N 蛋白的最佳包被浓度 (47ug/ml),并将除抗原包被外的所有操作步骤均置于室温进行,使得本方法具有更好的可操作性。本方法所用的显色底物为四甲基联苯胺 (TMB),该底物具有对光稳定性强、毒性相当弱且具备良好的敏感性和反应能力,显色后肉眼观察比较醒目、分明,对比明显。在相关步骤中,反应时间已确定,使整个检测过程有量化要求,大大加快了检测效率,增强了其实用性。笔者使用很低浓度的氟化氢 (HF) 作为终止液,取得了令人满意的终止效果,况且低浓度的 HF 远比硫酸作为终止液要安全的多,是一种值得推荐的终止液。

本研究中,对该方法的检测结果的判定标准作出了初步确定。通过对大量的已知背景的血清样品用本方法与 IDEXX 公司试剂盒分别进行检测,掌握了阴、阳性血清 OD 值的分布区间,从中得到了阴、阳性血清在两种方法中的统计学分布规律,为重组 N 蛋白-ELISA 方法的判定标准提供了有力依据,同时为本方法的可行性、可信度提供了良好的保证。

应用本方法对国内一些地区收集到的血清进行检测,并与 IDEXX 公司的试剂盒的检测结果相比较,与后者的检出符合率达 91%。从检测结果也可以得出,由于包被抗原具有较强的反应原性,使得同一批血清中用本方法检测得阳性率要高于后

者。笔者认为,在保证本方法的特异性及敏感性的基础上,用以检测 PRRS 的血清抗体是可行的。

### 参考文献

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, PO J M A, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: isolation of lelystac virus [J]. *Vet Q*, 1991, 3: 121- 130.
- [2] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in virus in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *J Vet Diag Inv*, 1992, 4: 117-126.
- [3] Dea S L, Wilson L, Therrien D, *et al.* Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E.coli-expressed nucleocapsid protein as antigen. *J Virol Meth* 2000, 87: 109-122
- [4] Denac H, Christian M, Jon DT, *et al.* An indirect ELISA for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid as antigen. *J Virol Method.* 1997, 65(2): 169-181.
- [5] 芦银华, 许立华, 华修国, 等. 猪圆环病毒乙型及猪繁殖与呼吸综合征病毒的快速检测[J], *中国病毒学*, 2003, 18(2): 184-186.
- [6] 许立华, 芦银华, 胡志华, 等. 猪繁殖与呼吸综合征 N 基因的克隆与高效表达载体的构建[J], *中国病毒学*, 2003, 18(3): 279-282.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 880-888.