

猪伪狂犬病血清抗体 gB - ELISA 检测方法的建立

罗飞^{1,2}, 李宇琴³, 陈义平¹, 周洁^{1,2}

(1. 中国动物卫生与流行病学中心诊断液研究室, 山东青岛 226032; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009;

3. 湖南九鼎科技(集团)有限公司, 湖南岳阳 414000)

[收稿日期]2011-04-25 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2011)07-0010-04 [中图分类号]S852.65

[摘要] 用纯化的猪伪狂犬病病毒 gB 重组蛋白为抗原, 建立了检测猪伪狂犬病血清抗体的 gB - ELISA 方法。最佳反应条件为: 抗原包被浓度为 3.15 μg/mL, 待检血清稀释度为 1:40。该方法对猪圆环病毒病、猪瘟、猪细小病毒病、猪繁殖与呼吸综合征(猪蓝耳病)、猪乙型脑炎、猪布氏杆菌病 5 种疾病阳性血清和 SPF 猪阴性血清检测呈阴性反应。批间、批内试验变异系数均不超过 8%。用该方法与 HerdChek ELISA 试剂盒同时对 119 份血清进行了平行检测, 其相对敏感性、特异性和符合率分别为: 75%、80.7% 和 79%。试验结果表明: 猪伪狂犬病血清抗体 gB - ELISA 检测方法具有较高的敏感性和特异性, 且重复性好, 可用于猪伪狂犬病毒血清抗体检测。

[关键词] 猪伪狂犬病毒; 抗体; gB - ELISA

Establishment of the Indirect ELISA for the Detection of Viral Glycoprotein B Antibodies against Swine Pseudorabies

LUO Fei^{1,2}, LI Yu-qin³, CHEN Yi-ping¹, ZHOU Jie^{1,2}

(1. Diagnostic Reagent Laboratory, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 3. Hunan Jiuding Technology(Group)Co., Ltd, Yueyang, Hunan 414000, China)

Abstract: The gB - ELISA was established by using the purified recombinant protein as antigen for detecting PRV antibodies in pig sera. All reaction conditions of this gB - ELISA were explored. The optimal coating concentration of antigen is 3.15 μg/mL, the serum sample was diluted to 1:40. The results are negative when the antiserum against PCV, PPV, HCV, JEV and PRRS were detected by this gB - ELISA. The CV between and within batches of detection were less than 8%. 119 pig sera samples were simultaneously detected by this indirect gB - ELISA and HerdChek gB ELISA kit. The relative sensitivity and specificity of indirect gB - ELISA established in the study were 75% and 80.7%. The coincidence rate between these two ELISA was 79%. All results showed that this assay had a good sensitivity, specificity and repeatability, it could be used for detection of PRV antibody in pig sera.

Key words: swine pseudorabies virus; antibody; gB - ELISA

伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)是疱疹病毒科(Herpesviridae)α疱疹病毒亚科的成员,可

引起猪、牛、羊及野生动物的伪狂犬病,猪是其主要宿主。伪狂犬病给养猪业造成了巨大的经济损

基金项目:“十一五”国家科技支撑项目(2006BAD6A13)

作者简介:罗飞(1984年-),男,湖南人,硕士,研究方向为猪病综合防控。E-mail:lf2032004@163.com

通讯作者:陈义平,研究员,动物疫病诊断试剂研发。

失^[1]。为了加强对该病的疫情监测和流行病学调查,有必要研究开发出一种特异性强、敏感性高的血清学检测试剂。PRV的结构蛋白gB非常保守,具有良好的免疫原性且抗原表位分布清晰^[2-5]。可作为理想的血清学检测用抗原。

1 材料

1.1 抗原和血清 将笔者构建好的重组质粒pET-gB转入BL21(DE3)后经IPTG诱导表达,按照HisBind® Purification Kit说明书纯化蛋白,经NanoDrop® ND-1000分光光度计测得gB蛋白浓度为1 mg/mL。-20℃保存待用;伪狂犬标准阴、阳性血清、猪瘟、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征等几种病毒阳性血清,均由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.2 主要试剂 HerdChek ELISA试剂盒,美国IDEXX公司生产;辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG和TMB均为Sigma公司产品;其它常规试剂均为国产分析纯级产品。

2 方法

2.1 间接ELISA方法建立 采用方阵试验确定重组抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。取96孔酶标板,将纯化的gB重组蛋白用pH 9.6的碳酸盐缓冲液自上而下依次做1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120稀释,100 μL/孔,4℃作用过夜,取出用吐温-磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤3次,每次5 min。用2%牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,250 μL/孔,37℃作用2 h。将标准阴阳性血清作1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320倍比稀释,从左至右加入各孔,100 μL/孔,37℃作用30 min,洗涤(同上);随后每孔加

入100 μL稀释至工作浓度的兔抗猪IgGHRP;37℃作用30 min,洗涤(同上);每孔加入100 μL, TMB 37℃显色10 min,最后加入100 μL终止液终止反应,10 min内在酶标仪测定其OD₄₅₀值。根据P/N值确定抗原和抗体的最佳工作浓度。

2.2 反应时间的优化 固定抗原的包被浓度和血清稀释度,分别改变包被时间、封闭时间、待检血清作用时间、酶标二抗作用时间,选择最佳反应条件。

2.3 交叉试验 用建立的间接ELISA对猪圆环病毒、猪细小病毒、猪瘟病毒、猪日本脑炎病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行检测。

2.4 重复性试验

2.4.1 批内重复试验 选取不同OD₄₅₀值的8份血清样品,用建立的gB-ELISA进行8次批内重复检测,并计算变异系数。

2.4.2 批间重复试验 取8份血清样品分别用3个不同批次包被的酶标板进行检测,并计算变异系数。

2.5 与IDEXX ELISA检测试剂盒的比较 将临床送检的119份猪血清样品分别用建立的gB-ELISA和Herdcheck ELISA kit进行平行检测,比较建立的检测方法与Herdcheck ELISA kit检测结果的敏感性、特异性以及符合率。

3 结果

3.1 抗原与血清最佳稀释度的确定 方阵试验结果见表1。可见,当血清和抗原的稀释倍数比较低时,OD₄₅₀值都维持在一个较高的水平,但是随着稀释度达到一定程度时,开始产生明显的梯度变化。综合阴阳性值,P/N值以及抗原、抗体实际用量等因素,初步确定抗原320倍稀释,血清以40倍稀释为佳。此时抗原包被浓度为315 ng/孔。

表1 gB抗原和血清最佳稀释度的方阵试验

抗原	血清	10	20	40	80	160	320
40	positive	1.29	1.123	0.953	0.641	0.433	0.247
	negative	0.29	0.222	0.149	0.096	0.072	0.052
	P/N	4.448	5.059	6.396	6.677	6.014	4.75
80	positive	1.269	1.098	0.912	0.621	0.378	0.235
	negative	0.283	0.207	0.131	0.081	0.054	0.139
	P/N	4.484	5.304	6.962	7.667	7	1.691
160	positive	1.203	0.996	0.829	0.56	0.358	0.197
	negative	0.249	0.148	0.093	0.044	0.05	0.05
	P/N	4.831	6.73	8.914	12.727	7.16	3.94
320	positive	1.197	0.989	0.871	0.584	0.357	0.198
	negative	0.222	0.138	0.083	0.05	0.05	0.05
	P/N	5.392	7.167	10.494	11.68	7.14	3.96

(续表)

抗原	血清	10	20	40	80	160	320
640	positive	1.133	0.995	0.854	0.643	0.391	0.256
	negative	0.227	0.14	0.092	0.05	0.05	0.05
	P/N	4.991	7.107	9.283	12.86	7.82	5.12
1280	positive	1.138	0.996	0.844	0.622	0.429	0.262
	negative	0.223	0.133	0.075	0.05	0.05	0.05
	P/N	5.103	7.489	11.253	12.44	8.58	5.24
2560	positive	0.83	0.709	0.579	0.388	0.218	0.094
	negative	0.104	0.044	0.05	0.05	0.05	0.05
	P/N	7.981	16.114	11.58	7.76	4.36	1.88
5120	positive	0.786	0.691	0.609	0.441	0.271	0.146
	negative	0.121	0.071	0.05	0.05	0.05	0.05
	P/N	6.496	9.732	12.18	8.82	5.42	2.92

3.2 ELISA 反应程序 通过优化反应条件,建立的 ELISA 反应程序如下:以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释抗原至 3.15 μg/mL。室温静置 30 min 后,每孔包被 100 μL,4 °C 过夜,弃取孔内液体,用 PBST 洗 3 次,每次 5 min;用 2% BSA 封闭,250 μL/孔,4 °C 作用过夜,洗板同前;用样品稀释液将待检血清 40 倍稀释后,以 100 μL/孔加至各孔,37 °C 孵育 30 min,洗板同前;每孔加入 100 μL 兔抗猪酶标二抗,37 °C 孵育 30 min,洗板;每孔加入 100 μL,TMB37 °C 避光显色 10 min 后,每孔加入 100 μL 的终止液终止反应,10 min 内在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。检测时,每块酶标板上设两份阳性血清对

照,两份阴性血清对照。计算阳性血清平均值 OD_p 和阴性血清 OD_N 值,待检血清样品的 OD₄₅₀ ≥ 0.1 × OD_p + 0.9 × OD_N。判为阳性,反之则判为阴性。

3.3 交叉试验 猪圆环病毒、猪细小病毒、猪瘟病毒、猪日本脑炎病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清用建立的 gB-ELISA 方法进行检测,结果均为阴性,说明该方法高度特异。

3.4 重复性试验

3.4.1 批内重复性试验 选取不同 OD₄₅₀ 的 8 份血清样品,用建立的 gB-ELISA 方法进行 8 次批内重复检测,检测结果(表 2)变异系数均低于 8%,说明该检测方法具有良好的重复性。

表 2 gB-ELISA 批内重复性试验结果

血清	样品 OD ₄₅₀								统计分析		
	1	2	3	4	5	6	7	8	X	S	CV%
1	0.073	0.067	0.065	0.070	0.073	0.068	0.075	0.076	0.071	0.004	5.615
2	1.161	1.179	0.993	1.191	1.055	0.995	1.109	1.112	1.099	0.078	7.126
3	0.856	0.802	0.897	0.851	0.808	0.951	0.86	0.939	0.871	0.055	6.318
4	0.613	0.583	0.605	0.594	0.628	0.618	0.714	0.637	0.624	0.040	6.463
5	0.103	0.103	0.093	0.093	0.093	0.106	0.088	0.102	0.098	0.007	6.749
6	0.075	0.073	0.068	0.084	0.072	0.077	0.081	0.083	0.077	0.006	7.413
7	0.262	0.265	0.231	0.219	0.243	0.247	0.269	0.252	0.249	0.017	6.963
8	0.196	0.202	0.197	0.185	0.191	0.192	0.197	0.194	0.194	0.005	2.607

3.4.2 批间重复试验 用建立的 gB-ELISA,取 8 份血清样品分别用 3 个不同批次包被的酶标板进行检测,检测结果一致。

3.5 gB-ELISA 方法与国外 Herdchek gB 试剂和的比较 将 119 份猪血清样品分别用建立的 gB-ELISA 方法和 Herdchek ELISA kit 抗体检测试剂盒进行平行检测,结果见表 3。

表 3 间接 gB-ELISA 和 Herdchek ELISA kit 检测结果的比较

	Herdchek ELISA		
	阳性	阴性	合计
gB-ELISA	阳性	27	43
	阴性	9	76
	合计	36	119
	敏感性	75%	
	特异性符合率		80.7%
			79%

由表3可以看出, Herd check ELISA kit 检测为阳性的36份血清样品中, gB-ELISA 检测出27份阳性; Herd check ELISA kit 检测为阴性的83份血清样品中, 间接 gB-ELISA 检测出67份阴性。平行检测的119份血清样品中两种方法检测结果一致的有94份。与 Herdcheck ELISA kit 相比, 间接 gB-ELISA 的敏感性为75%, 特异性为80.7%, 符合率为79%。二者阳性检出率分别为30.25%、36.13%。

4 讨论

试剂盒开发过程中, 非特异性反应的强弱是建立 ELISA 诊断方法成功与否的关键。对比使用纯化的目的蛋白和未纯化的经尿素裂解的包涵体目的蛋白包被 ELISA 板检测血清发现, 包被抗原的纯度直接影响到非特异性反应的强弱。采用 His·Bind® 柱亲和层析的方法获得了高纯度的抗原蛋白, 为 ELISA 试剂盒开发提供了物质保证。在对大量临床样本的检测中不断改进工艺, 结果在猪血清样品检测时, 与阴性血清反应的本底值极低, 与强阳性血清反应的 OD₄₅₀ 高达2.0以上, 此外, 对 PRRS、CSF 等多种阳性血清的检测显示也均为阴性。证明所建立的检测方法具有好的敏感性和特异性。

本实验建立的间接 gB-ELISA 方法相对 IDEXX herdcheck 试剂盒敏感性为75%, 特异性为80.7%, 符合率为79%。两种方法检测结果的差异并非是由于试剂研制过程中的技术工艺所致, 在研究过程中已证明建立的间接 gB-ELISA 具有很高的灵敏度和很低的本底反应, 且不与无关血清反应。

对重组质粒 pET-gB 测序结果与各株 PRV gB 在同一区域序列进行比对, 结果与发表的 PRV 各分离株在扩增区序列同源性在97.8%以上, 其中与美国分离株 becker 株同源性最高, 达99.3%。推导氨基酸序列同源性在96.4%以上, 其中与美国分离株 becker 株同源性最高, 达99.0%。具有高度的一致性, 这就消除了所选目的片段本身损伤产生差异。同时也消除了间接 gB-ELISA 和 IDEXX

herdcheck 检测试剂盒之间产生差异的重要因素。

PRV gB 蛋白全长913个氨基酸残基, 其中1aa-40aa为信号肽段; 41aa-750aa为细胞外区段; 751aa-819aa为跨膜区; 820aa-913aa为细胞内区段。gB主要抗原表位分布情况, 主要在细胞外区的三段上, 且有线性和构象位点^[3]。本实验所选目的片段为502aa-697aa片段, 即为第三段上, 因此对于由前两端抗原位点产生的抗体无法检测。而 IDEXX Herdcheck 抗体检测试剂盒所选片段未知, 这可能是检测结果产生差异的重要原因。同时, IDEXX Herdcheck 试剂盒与本试验所建立的 ELISA 检测方法在原理上也不一致, 分别为阻断法和间接法, 由系统本身产生的差异也有可能。

另外, 本实验室曾采用 IDEXX Herdcheck、INGENASA公司(西班牙) Ingezim ELISA Kit 和自建的 gE-ELISA 平行检测了几十份临床血清发现, 自建的 gE-ELISA 方法检测结果与 Herdcheck 相比符合率为82.6%; 与 Ingezim ELISA Kit 相比符合率为93.6%; 两进口试剂盒监测46份血清的结果符合率为80.4%。而且, 不同国外厂商生产的猪繁殖与呼吸综合征抗体检测 ELISA 试剂盒以及其他疫病的 ELISA 试剂盒也同样存在结果差异。

参考文献:

- [1] 娄高明, 杜伟贤. 伪狂犬病流行概况及猪场防制策略[J]. 中国动物检疫, 1999, (5): 43-45.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [3] Zaripov M M, Morenkov O S, Shmatchenko V V, et al. Immunological and Functional Characteristics of Epitopes and Regions of gB Glycoprotein of Aujeszky's Disease Virus[J]. Vopr Virusol, 2001, 46(2): 41-45.
- [4] Dory D, Torche A M, et al. Effective Protection of Pigs against Lethal Pseudorabies Virus Infection after a Single Injection of Low-dose Sindbis-derived Plasmids Encoding PrV gB, gC and gD Glycoproteins[J]. Vaccine, 2005, 23(26): 3483-3491.
- [5] Zaripov M M. Distribution of B-cell Epitopes on the Pseudorabies Virus Glycoprotein B[J]. Journal of General Virology, 1990, (80): 5.