

应用 GPV VP3 基因重组原核表达产物建立检测抗体的 ELISA 方法研究

布日额^{1,2}, 李宝臣³, 马波¹, 王君伟^{1*}, Ulrich Neumann⁴

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 内蒙古民族大学动物科技学院, 通辽 028042;

3. 农业部青岛动植物检疫局, 青岛 266000; 4. 汉诺威兽医学院, 汉诺威 30559)

摘要: 利用鹅细小病毒(GPV)VP3 基因的原核表达蛋白作为包被抗原建立了检测 GPV 抗体的间接-ELISA 及 Dot-ELISA 方法。经确定两种方法的抗原包被浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中间接-ELISA 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 、Dot-ELISA 5 $\mu\text{L}/\text{点}$ 。间接-ELISA 中 HRP 标记的兔抗鹅 IgG 的工作浓度是 1 : 200, 检测血清的最适稀释度是 1 : 400, 阳性判定标准为 $\text{OD}_{492} \geq 0.20$, 且 $\text{P}/\text{N} \geq 2.0$ 。用此方法检测弱毒疫苗免疫血清, 其抗体滴度在 1 : 400~1 : 51 200。Dot-ELISA 的结果与间接-ELISA 的结果一致。

关键词: 鹅细小病毒; VP3 基因重组原核表达产物; 间接-ELISA; Dot-ELISA

中图分类号: S858.335.3; S854.4⁺3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)02-0199-05

Development of ELISA Methods to Detect Antibody by Prokaryotic Recombinant Expression Product of GPV VP3 Gene

BU Ri-e^{1,2}, LI Bao-chen³, MA Bo¹, WANG Jun-wei^{1*}, Ulrich Neumann⁴

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities,

Tongliao 028042, China; 3. Qingdao Animal and Plant Quarantine Bureau, Qingdao

266000, China; 4. The Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover 30559, Germany)

Abstract: Indirect-enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect-ELISA) and nitrocellulose blotting membrane (dot blot ELISA) were developed for the detection of antibodies against GPV in goose by recombinant GPV VP3 gene prokaryotic expression product. The amount of incubating antigen were 12.5 μg and 0.625 μg respectively. And working concentration of rabbit anti-goose IgG-HRP antibody was 1 : 200, the suitable concentration of detected sera was 1 : 400. The standards to estimate positive were $\text{OD}_{492} \geq 0.2$, $\text{P}/\text{N} \geq 2.0$ for the Indirect-ELISA method. ELISA antibody titers of detected sera immunized with attenuated vaccine were in 1 : 400—1 : 51 200. The results of Dot-ELISA were consistent with the results of Indirect-ELISA.

Key words: goose parvovirus; recombinant VP3 gene prokaryotic expression product; indirect-ELISA; Dot-ELISA

鹅细小病毒感染 (Goose parvovirus infection, GPVI) 是由鹅细小病毒 (Goose parvovirus, GPV)

收稿日期: 2004-10-15

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (重大项目 10541z004)

作者简介: 布日额 (1962-), 男, 蒙古族, 通辽人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学及免疫学研究。E-mail: wjhbre@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 王君伟 (1960-), 绥化市人, 教授, 博士生导师。E-mail: jwwang@mail.neau.edu.cn

引起的雏鹅及雏番鸭的急性、致死性、高度接触性传染病。该病自1956年首次被报道至今,仍是危害养鹅业最严重的疫病之一,死亡率可达90%~100%,极大地影响着集约化养鹅业的发展。过去对该病的诊断通常根据流行病学表现、临床症状、病理变化等作出初步诊断^[1]。但对小鹅瘟临床病例和人工实验性感染病例进行研究中发现,有相当一部分病例缺乏明显的临床和病理学特征,难以做出初步诊断。常用的辅助性诊断方法有琼脂扩散试验、中和试验、琼脂扩散抑制试验等血清学方法,也有用免疫荧光技术直接检测病原进行诊断^[1]。近年来,对GPV检测方法的研究取得了长足进展。VP3基因片段是GPV主要的抗原表位区,其编码蛋白能够诱导产生中和抗体^[2]。因此,对VP3基因的研究逐渐成为内外研究GPVI的重点和热点,为建立诊断鹅细小病毒感染的分子生物学方法进行了大量研究^[2~8]。GPV只有一种血清型,且感染后7d即可产生抗体^[5],这为建立ELISA快速血清学诊断方法提供了方便。ELISA检测方法是较为成熟的简便、快速、特异、敏感、便于临床推广应用的诊断方法,已在众多疫病的诊断中得到应用。本研究应用GPV VP3基因重组原核表达蛋白作为包被抗原,建立检测GPV抗体的间接-ELISA及Dot-ELISA方法,为GPVI的诊断和GPV免疫抗体的检测提供准确、快速的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

VP3/GST融合蛋白为笔者课题组制备;鹅抗GPV抗体及兔抗鹅IgG-HRP标记抗体为自行制备;鸡抗GPV抗体血清为自备;SPF鸡血清为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家生物技术重点实验室提供;兔抗鸡IgG酶标抗体为Sigma公司产品;鹅副黏病毒(GPMV)及禽流感AIV(H9N2)抗体血清由笔者实验室提供;96孔聚苯乙烯酶标板为美国Corstar公司产品;硝酸纤维素膜(NCM)为Pall-Gelman公司产品。

1.2 VP3/GST融合蛋白反应原性鉴定

将VP3/GST融合蛋白原核表达产物经亲和层析纯化后,用Western blot及Dot-ELISA方法鉴定纯化产物的反应原性。

1.3 GPV抗体的间接ELISA的建立

1.3.1 检测方法的标准化 酶标抗体工作浓度的

确定:纯化抗原按125 μg/mL包被ELISA反应板,每孔100 μL,把阳性血清1:400稀释,酶标二抗按1:200、1:400、1:800进行系列稀释后,依次加入反应孔中,用间接-ELISA方法测定。选择阳性血清的OD₄₉₂值接近1.0,阴性血清的OD₄₉₂值较小(0.08左右),P/N值最大的酶标抗体稀释度为最适工作浓度。

样本血清最佳稀释度的确定:检测抗原按125 μg/mL包被酶标板,样本血清按上述稀释,每孔100 μL,每个稀释度2列;酶标抗体按工作浓度进行反应,用间接-ELISA方法测定。选择阳性血清的OD₄₉₂值接近1.0,阴性血清的OD₄₉₂值较小,且P/N值最高的稀释度。

1.3.2 间接-ELISA检测操作流程 参照朱立平等^[3]等描述的方法进行。应用自行制备的VP3/GST融合蛋白抗原,小鹅瘟阳性血清和非免疫鹅血清进行间接ELISA试验。

1.3.3 特异性试验

1.3.3.1 交叉试验:用纯化抗原包被酶标板,与1:400稀释的GPV、AIV、GPMV抗体及GPV阳性血清及阴性血清反应,进行间接ELISA测定。

1.3.3.2 阻断试验:取GPV灭活苗免疫鹅血清于1.5 mL EP管中作1:200~1:25 600倍比系列稀释,各稀释度分别加等量的含GPV鹅胚尿囊液(含7 000LD₅₀),37℃感作2 h,与未用病毒液处理的阳性血清及阴性血清同时作ELISA测定,测定其阻断率。抑制率按公式(N-T)/N计算统计,N为未经病毒液处理的阳性血清的OD₄₉₂值,T为经病毒液处理的阳性血清的OD₄₉₂值。

1.3.4 阳性结果的判定标准 用全自动酶标检测仪测定OD₄₉₂值,当吸光值超过规定吸收值时判为阳性,否则为阴性。规定吸收值为20份阴性血清分别进行1:400~1:51 200稀释进行方阵试验,对ELISA试验结果进行统计处理,得出阴性血清的平均OD₄₉₂值(X),再统计出其标准差(SD),确定判定阳性的OD₄₉₂值临界值和P/N临界值。

1.4 检测GPV抗体的Dot-ELISA的建立

1.4.1 Dot-ELISA检测方法的标准化 酶标二抗工作浓度的确定:将定量的纯化鹅血清IgG(100 ng/μL)点于纤维素膜上,每点2 μL鹅血清IgG,共5点,将每个点样膜按Dot-ELISA操作程序分别与稀释成1:10、1:20、1:40、1:80、1:160的兔抗鹅IgG酶标抗体结合,加入底物37℃避光显色,选

择斑点显色清晰的酶标二抗的稀释度作为工作浓度。

检测抗原适宜浓度的确定:将纯化的 VP3 检测抗原(5.0 mg/mL)按 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 进行倍比系列稀释,每点加样 5 μ L,使抗原包被量分别为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156 μ g/点。按 Dot-ELISA 操作步骤进行检测。选择斑点颜色清晰,阴性对照斑点为无色的浓度作为抗原工作浓度。

1.4.2 Dot-ELISA 检测 GPV 抗体的操作流程

取适当大小的硝酸纤维素膜经处理后放置在 96 孔斑点加样器内,将抗原按适宜浓度加于孔内膜上,每点 5 μ L,同时用负压泵抽吸,应用自行制备对照的小鹅瘟阳性血清、阴性血清及被检鹅血清,参照朱立平等^[3]描述的方法进行 Dot-ELISA 试验。

1.4.3 结果判定 凡出现明显规则蓝灰色或蓝紫色斑点者判为阳性(+);与阴性对照相同、不出现明显可见斑点者或斑点不清晰者判为阴性(-),介于两者之间的判为可疑(\pm)。

1.4.4 特异性试验

1.4.4.1 交叉试验:将纯化抗原 0.125 μ g/ μ L 点于硝酸纤维素膜上,共 8 点,每个血清稀释度 2 点,每点 5 μ L 抗原(0.625 μ g),按 Dot-ELISA 操作程序检测。交叉试验血清为鸡抗 GPMV、AIV(H9N2 株)血清,相应的对照血清为 SPF 鸡血清,酶标二抗为兔抗鸡 IgG 酶标抗体。

1.4.4.2 阻断试验:同步骤(1.4.2)进行 Dot-ELISA 试验。

1.5 检测 GPV 抗体的间接-ELISA 及 Dot-ELISA 方法的应用

用已知的小鹅瘟阳性血清及阴性血清作为对照,按照各自相应的操作流程,用建立的间接 ELISA 方法和 Dot-ELISA 方法分别对 48 份和 16 份接种 GPV 弱毒苗的成年鹅血清进行了检测。

2 结果

2.1 VP3/GST 融合蛋白反应原性鉴定

对纯化的 VP3/GST 融合蛋白经 Western blot 及 Dot-ELISA 方法鉴定结果表明,表达蛋白与鹅抗 GPV 抗体血清特异性结合出现了明显的显色印迹和斑点,对照阴性血清无显色反应。

2.2 间接-ELISA 检测 GPV 抗体方法的建立

检测抗原最适包被浓度为 125 μ g/mL;兔抗鹅 IgG 酶标二抗和兔抗鸡 IgG 酶标二抗的工作浓度分别为 1:200 及 1:10 000;检测血清的稀释度为 1:400。

判定阳性的标准:血清样品 OD₄₉₂ 值 \geq 0.20,且 P/N \geq 2.0,可判为阳性,反之为阴性。

特异性试验结果表明,GPV VP3/GST 重组融合蛋白只与 GPV 抗血清发生特异性结合,而与 AIV 及 GPMV 抗血清不发生交叉反应;阻断试验结果表明,阳性血清的稀释度在 1:400~1:25 600 时,鹅胚尿囊液中 GPV 对抗体的阻断率为 90%~96%,基本呈线性相关,证明尿囊液中 GPV 对血清与包被抗原的结合有着很强的抑制作用,同时也证明包被抗原与血清的结合是特异性的(见表 1)。

表 1 VP3 抗原间接-ELISA 阻断试验结果(OD₄₉₂)
Table 1 Blocking assay of indirect-ELISA by VP3 antigen

血清类别 Serum	GPV 处理 Treatment with GPV	血清稀释度 Dilution of serum						
		1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600
阳性血清 Positive serum	N	1.955	1.303	1.059	0.944	0.794	0.660	0.419
阳性血清 Positive serum	T	0.184	0.108	0.077	0.067	0.046	0.036	0.015
阴性血清 Negative serum	N	0.087	0.060	0.021	0.008	0.002	0.000	0.000
阻断率/%Rate of blocking		90.5	91.7	92.7	93.0	94.2	95.0	96.0

N 表示正常鹅胚尿囊液;T 表示含 GPV 鹅胚尿囊液

N indicated normal goose allantoic fluid;T indicated goose allantoic fluid containing GPV

2.3 间接-ELISA 检测 GPV 抗体方法的应用

对接种 GPV 弱毒苗的成年鹅 48 份血清的免疫抗体效价进行检测,一定程度上反映了弱毒苗免疫抗体的消长规律(见表 2)。该研究应用中和试验及

所建立的间接-ELISA 方法对同一个体免疫抗体消长情况进行了检测比较。结果表明,ELISA 检测结果与中和试验结果相一致。ELISA 检测方法的平均灵敏度比中和试验方法高出 3 倍,进一步表明了

所建立方法的可靠性(见表 3)。

表 2 GPV 弱毒疫苗免疫鹅血清 ELISA 抗体效价

Table 2 ELISA antibody titers of serum samples from geese immunized with GPV attenuated vaccines

免疫日龄 Days of immune	ELISA 效价分布 Distribution of ELISA titer								血清份数 Numbers of samples	血清几何平均效价 Average titer of serum
	Distribution of ELISA titer									
	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200		
0 日龄	2	3	2	3	0	0	0	0	10	1:640
7 日龄	1	0	2	4	2	1	0	0	10	1:4200
14 日龄	3	2	2	2	1	0	0	0	10	1:1880
21 日龄	0	2	2	5	3	0	0	0	12	1:3333
68 日龄	0	0	0	0	4	2	0	0	6	1:8533

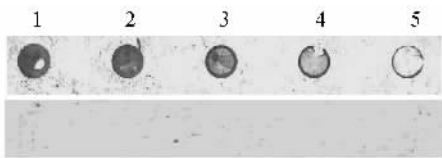
表 3 GPV 疫苗免疫血清间接 ELISA 抗体滴度与中和抗体效价的比较

Table 3 Comparison of titer of indirect ELISA and neutralizing test

2 次免疫后采血时间/d The day of sampling after twice immune	间接 ELISA 抗体滴度 Antibody titer of indirect-ELISA	中和抗体效价 Neutralization antibody titer
0	1:800	0
7	1:12800	1:3160
14	1:3200	1:478
21	1:3200	1:478
68	1:12800	1:4220

2.4 Dot-ELISA 检测 GPV 抗体方法的建立

试验结果表明, Dot-ELISA 检测抗原的工作浓度为 $0.625 \mu\text{g}/\text{点}$ (见图 1)。纯化的 GPV VP3 重组抗原只与 GPV 阳性血清发生特异性结合,而与对照血清未发生交叉反应(见图 2);阻断试验结果表明,当鹅抗 GPV 阳性血清被稀释到 $1:12800$ 倍后能够被 GPV 所阻断(见图 3)。



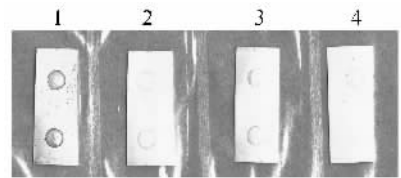
1. $2.5 \mu\text{g}/\text{dot}$; 2. $1.25 \mu\text{g}/\text{dot}$; 3. $0.625 \mu\text{g}/\text{dot}$;
4. $0.313 \mu\text{g}/\text{dot}$; 5. $0.156 \mu\text{g}/\text{dot}$

图 1 Dot-ELISA 检测抗原最佳包被浓度确定

Fig. 1 Determination of the suitable incubating concentration of VP3 purified protein for Dot-ELISA

2.5 Dot-ELISA 检测 GPV 抗体方法的应用

对 16 份用间接-ELISA 方法检测阳性的鹅抗 GPV 血清用建立的 Dot-ELISA 方法进行检测。结果表明, Dot-ELISA 方法的阳性检出率达 100%, 其结果与间接-ELISA 方法结果一致。

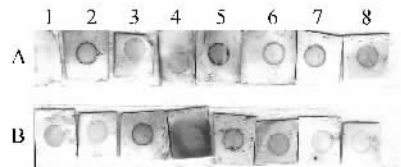


1. GPV 阳性血清; 2. GPMV 阳性血清; 3. AIV 阳性血清; 4. SPF 鸡血清

1. Positive serum of GPV; 2. Positive serum of GPMV;
3. Positive serum of AIV; 4. SPF chicken serum

图 2 Dot-ELISA 特异性试验

Fig. 2 Specificity assay of Dot-ELISA



A. 正常鹅胚尿囊液处理组; B. 含 GPV 鹅胚尿囊液处理组

A. The serum treated with normal goose allantoic fluid; B. The serum treated with goose allantoic fluid containing GPV

1. $1:200$; 2. $1:400$; 3. $1:800$; 4. $1:1600$; 5. $1:3200$; 6. $1:6400$; 7. $1:12800$; 8. $1:25600$

图 3 Dot-ELISA 阻断试验

Fig. 3 Blocking assay of Dot-ELISA

3 讨 论

Zadori 等^[2]通过 GPV 衣壳蛋白氨基酸三维结构模拟比较分析发现,暴露于病毒粒子表面的氨基酸序列均出现在 VP3 蛋白多肽链内,表明 VP3 内含有 GPV 主要抗原决定簇成分。GPV VP3 蛋白是病毒的主要衣壳蛋白,约占衣壳蛋白总量的 80%,能诱导机体产生具有中和作用的抗体。因此,VP3 基因是研制基因工程疫苗和检测抗原的最佳候选基因。近年来,国内外学者对 GPV 衣壳蛋白不同片段基因进行克隆及表达研究^[4,7,10],但一直未见进一步应用研究的相关报道。本试验应用纯化的 VP3/GST 融合基因重组原核表达产物建立了检测 GPV 抗体的间接-ELISA 及 Dot-ELISA 方法。这些方法所用的抗原是重组基因表达产物,并非全病毒。因此,绝无散毒及潜伏感染等危险,并且特异性高。

应用建立的间接-ELISA 方法对 GPV 弱毒疫苗免疫鹅血清抗体消长规律进行了定量检测。结果表明,免疫当天至免疫后 68 d 的 ELISA 抗体滴度几何平均值分布于 1:640~1:8 533(见表 2),基本反映了抗体消长的实际规律,Dot-ELISA 检测的结果与此相一致。

本试验在国内外首次应用 GPV VP3 基因重组原核表达产物建立检测 GPV 抗体的间接-ELISA 及 Dot-ELISA 方法,为 GPVI 进行准确、快速的诊断及 GPV 全毒疫苗免疫抗体的检测及流行病学调查提供了有效的方法。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1997. 1147.
- [2] Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, *et al.* Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2[J]. *Virology*, 1995, 212(2):562~572.
- [3] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000. 360~361.
- [4] 布日额,王君伟,吴金花,等. 地高辛标记核酸探针检测鹅细小病毒的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(1): 102~105.
- [5] 陈宏远,周碧君. 鹅细小病毒感染的研究进展[J]. *山地农业生物学报*, 2003, 22(3):259~265.
- [6] 布日额,王君伟,吴金花,等. GPV VP1-VP3 非重叠序列基因片段的克隆及原核表达[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(10):3~6.
- [7] 李宝臣,齐岩,马波,等. 鹅细小病毒不同毒株 VP3 基因的克隆与序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(6):430~433.
- [8] 布日额,王君伟,吴金花,等. 应用 PCR 技术检测鹅细小病毒[J]. *畜牧与兽医*, 2003, 35(6):8~11.
- [9] Le Gall-Recule G, Jestin V, Chagnawd P, *et al.* Expression of muscovy duck parvovirus capsid protein (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2 159~2 163.
- [10] 贺云霞,王君伟,马广鹏,等. 鹅细小病毒 VP2 基因原核及真核表达载体的构建[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(5):30~33.