

# 鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原表位的串联表达及间接 ELISA 方法的建立

孙罗美<sup>1</sup>, 易林<sup>1</sup>, 邹年莉<sup>1</sup>, 柳萍<sup>1,2</sup>, 黄勇<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

**摘要:** 本研究旨在建立一种快速、简便的鸡传染性支气管炎抗体的检测方法。通过生物信息学软件对传染性支气管炎病毒(IBV)ZY3株的S1蛋白进行分析后,筛选出4段S1蛋白抗原表位优势区域(F1~F4),将4段表位串联成1条新基因F,对F基因编码的蛋白质进行二级结构预测,结果表明该蛋白抗原指数性高且具有良好的柔韧性。构建重组表达载体pET-32a(+)-F,并在原核表达系统中表达,获得大小为42 ku的融合蛋白,经Western blot分析表明表达的串联蛋白具有良好的反应原性。以纯化的串联蛋白作为包被抗原,建立了一种检测IBV抗体的间接ELISA方法。利用建立的ELISA方法对采集来175份血清样品进行检测,并与商品化试剂盒进行对比,显示其阳性符合率为90.2%,阴性符合率为85.7%,总体符合率为89.7%,表明建立的ELISA方法具有良好的特异性、重复性和敏感性。

**关键词:** 传染性支气管炎病毒;S1蛋白;表位串联;间接ELISA;建立

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1780-08

## Development of an Indirect ELISA of Infectious Bronchitis Virus by Using Tandem Epitopes of S1

SUN Luo-mei<sup>1</sup>, YI Lin<sup>1</sup>, ZOU Nian-li<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1,2</sup>, HUANG Yong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** The aim of this study was to establish an indirect ELISA for detection of antibodies against avian infectious bronchitis (IB). The published amino acid sequences of S1 gene of avian Infectious bronchitis virus (IBV) strain ZY3 were analyzed by bioinformatics software, and four dominant epitopes named as F1, F2, F3 and F4 were selected and ligated together as a chimeric gene F. Bioinformatic analysis showed that this protein if highly antigenic and flexible. Then the chimeric gene was then inserted into expression vector pET-32a(+) for the expression of target gene and a 42 kD recombinant protein was obtained. The result of western-blot showed that the chimeric protein could react specifically with anti-IBV positive serum. An indirect ELISA was then developed using purified protein as coating antigen. 175 sera samples were examined by this ELISA and commercial kit, the results showed that the positive coincidence rate could reached 90.2%, negative coincidence rate could reached 85.7%, and the total coincidence rate reached 89.7%. The results indicated that the indirect ELISA was sensitive and specific, and no cross-reaction with positive sera of other chicken diseases. The indirect ELISA for detection of chicken

收稿日期: 2012-04-23

基金项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IRTO848)

作者简介: 孙罗美(1986-), 女, 四川彭州人, 硕士生, 主要从事家禽传染病的研究, E-mail: mysilm@163.com

\* 通讯作者: 黄勇, 教授, E-mail: hyong601@163.com

antibodies against Infectious bronchitis were successfully developed.

**Key words:** Infectious bronchitis virus (IBV); S1 protein; tandem epitopes; indirect ELISA; develop

鸡传染性支气管炎(Infectious bronchitis, IB)是由传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)引起的一种急性、高度接触传染性、病毒性呼吸道疾病。各种日龄、不同品种的鸡均易感染,尤以 1~4 周龄雏鸡最为严重,死亡率高达 40%~90%。虽然广泛使用疫苗预防,但 IB 并未得到有效控制,而且变异株或新的基因型不断出现,给世界养禽业带来巨大经济损失<sup>[1-4]</sup>。

IBV 的基因组由单股正链 RNA 组成,长 27~30 kb,基因组编码主要结构蛋白:纤突蛋白(S)、核衣壳蛋白(N)、膜蛋白(M)和小膜蛋白(E)。S 蛋白是 IBV 最重要的保护性抗原,S 蛋白翻译后被宿主细胞的蛋白酶切割为等摩尔的 S1 蛋白和 S2 蛋白。其中 S1 蛋白是诱导中和抗体和血凝抑制抗体产生的主要免疫原,在决定 IBV 血清型特异性、组织嗜性及其毒力方面也具有一定作用<sup>[5-6]</sup>。因此,可以用重组的 S1 蛋白或其截短片段作为诊断抗原,用于 IBV 抗体的检测。

目前用于 IB 抗体检测的实验室方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)、琼脂扩散沉淀试验(AGP)和病毒中和试验(VN)等方法。3 种检测方法均有较好的特异性,但 AGP 灵敏度较差;中和试验操作复杂、费时且需要较高的实验室条件,ELISA 方法由于其速度快、对实验条件要求不高、不需无菌操作、短时间内能检测大量样品,适用于实验室血清诊断以及大规模的疫病调查<sup>[7]</sup>。本研究利用 DNASTar 软件对 GenBank 上发表的 IBV ZY3 毒株 S1 蛋白的氨基酸序列进行分析,同时结合文献报道<sup>[8-11]</sup>,筛选出 IBV S1 蛋白 4 段抗原性强,高度亲水、柔性好的抗原表位优势区(F1~F4),利用相同酶切位点串联 4 段抗原表位,在抗原片段间加入柔性序列 G<sub>4</sub>S 以确保各抗原表位形成各自的高级结构,不影响串联蛋白的生化特性。构建原核表达载体 pET-32a(+)-F,并在原核表达系统中表达,用纯化的串联蛋白作为包被抗原,通过条件的优化,建立间接 ELISA 检测方法,并对该方法的特异性、重复性和敏感性进行探索,显示了良好的应用前景,为进一步组装成试剂盒奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株和血清 IBV 四川分离株(ZY3)由作者实验室分离保存; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞由作者实验室制备并保存;pMD19-T 载体购自大连宝生物有限公司,载体 pET-32a(+ )本实验室保存; AIV (H5)、AIV (H9)、NDV、IBDV 标准阳性血清均购自哈尔滨维科生物技术开发公司; IBV 阳性血清、阴性血清均由作者实验室制备。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、Ex Taq 酶、T4 DNA Ligase、蛋白质相对分子质量标准(低)等购自宝生物工程(大连)有限公司; DAB 底物显色试剂盒,购自成都博瑞克生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鸡 IgG,购自北京博奥森生物技术有限公司; 质粒小量提取试剂盒、可溶性单组分 TMB 购自北京天根生化科技有限公司; 96 孔可拆酶标板,购自美国康宁公司; 其余试剂均为国产分析纯。引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.2 引 物

利用 DNASTar 分析软件分析预测 IBV ZY3 毒株 S1 蛋白的二级结构、抗原性指数、亲水性、柔韧性,筛选出 4 段抗原性强,亲水性和柔韧性好的优势表位区(F1:26~51 AA、F2:165~249 AA、F3:295~391 AA 及 F4:464~505 AA)。参照大肠杆菌密码子偏爱表,在表位间加入柔性肽(Gly<sub>4</sub>Ser); F1 片段 5'端引入起始密码子; F4 片段 3'端引入终止密码子,详见表 1。

### 1.3 抗原表位基因 F 原核表达载体的构建

参照 TaKaRa RNaiso Reagent 试剂使用说明书提取病毒总 RNA。用 Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit 反转录试剂盒反转录合成 cDNA。F1、F2、F3 和 F4 分别用 50  $\mu$ L 体系扩增,PCR 产物经胶回收后,进行 TA 克隆,酶切鉴定为阳性的转化菌,送上海英骏生物技术有限公司测序。经测序正确后分别命名为 pMD19-T-F1、pMD19-T-F2、pMD19-T-F3 和 pMD19-T-F4。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	位置/bp	序列(5'-3')	限制性内切酶
Name	Location	Sequence	Restriction enzymes
F1	26~51	<b>GGATCCA</b> <i>TGA</i> ATTATGTGTACTACTACCAAAG	<i>Bam</i> H I
		<b>GAATTC</b> ACTACTGCATAAGCACCCC	<i>Eco</i> R I
F2	165~249	<b>GAATTC</b> <u>GGTGGTGGCGGTAGCA</u> ACTCCACATCTGTT	<i>Eco</i> R I
		<b>TCTAGA</b> AGTAAAAGGATAAAAAGCCGTC	<i>Xba</i> I
F3	295~391	<b>TCTAGA</b> <u>GGTGGTGGCGGCAGCT</u> ATCAAACACACAACAG	<i>Xba</i> I
		<b>GTCGAC</b> <u>GCTGCCGCTCCTCCT</u> TACACTGAATAAACAC	<i>Sal</i> I
F4	464~505	<b>GTCGAC</b> GGGTTAGCTATTTTAGATACTTC	<i>Sal</i> I
		<b>CTCGAG</b> <i>TTAG</i> CCACCAGACACTACAAAC	<i>Xho</i> I

加粗是限制性内切酶序列；下划线是柔性肽序列；斜体加粗是起始密码子和终止密码子

Blodded means restriction sites; underline means flexible peptide sequence; bold italics means initiation codon and termination codon

*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pMD19-T-F1, 胶回收 F1 片段; *Eco*R I 和 *Xba*I 双酶切重组质粒 pMD19-T-F2, 胶回收 F2 片段; 将胶回收的 F1 和 F2 用 T4 连接酶连接, 用连接产物做模板进行 PCR 扩增得到 F12 片段, 胶回收表位 F12, 克隆入 T 载体, 测序正确后命名为 pMD19-T-F12。同理, 依次酶切 pMD19-T-F3 和 pMD19-T-F4, 依次将 F3 和 F4 片段与 F12 连接, 成功构建重组质粒 pMD19-T-F(即 pMD19-T-F1234)。将该重组质粒用 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切后, 回收串联的抗原表位 F, 通过 *Bam*H I 和 *Xho*I 位点接入 pET32a(+)空载体上, 并转化至 DH5 $\alpha$  宿主菌, 将酶切鉴定正确的重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

#### 1.4 F 基因的诱导表达与表达产物的纯化

将测序正确的 pET-32a(+)-F/DH5 $\alpha$  菌提取质粒, 转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 取 150  $\mu$ L 涂布于含 Amp(100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的 LB 琼脂平板中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单个白色菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中振荡培养过夜。然后按 1:100 比例扩大振荡培养, 待 OD 值达到 0.6 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h, SDS-PAGE 电泳检测表达产物。

反复冻融表达菌体 3 次, 超声波破碎菌体 4 次, 间歇进行, 对破碎后的菌液 4  $^{\circ}$ C 10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 分离裂解液上清和沉淀,

SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白的表达形式。采用洗涤包涵体的方法在变性条件下去除杂蛋白, 将变性的纯蛋白在不同尿素浓度下透析逐步复性。经 SDS-PAGE 电泳检测纯化重组蛋白, 并用核酸蛋白仪测定纯化的重组蛋白的浓度。

#### 1.5 原核表达产物的 Western blot 分析

重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 于半干式转移电泳仪以恒压 1 V  $\cdot$  cm<sup>-2</sup> 转移 60 min, 取出硝酸纤维素膜 (NC), TBST 漂洗, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, TBST 漂洗, 加入鸡传染性支气管炎阳性血清, TBST 漂洗, 再加入 HRP 标记的羊抗鸡 IgG, TBST 漂洗, 将 NC 膜放入 HRP-DAB 显色液中, 出现条带后立即用双蒸水终止显色, 观察结果。

#### 1.6 间接 ELISA 检测方法的建立

1.6.1 最佳工作条件的确定 用 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH9.6) 稀释纯化的 F 蛋白至 50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 100  $\mu$ L  $\cdot$  孔<sup>-1</sup>, 37  $^{\circ}$ C 包被 1 h 后, 取出用 PBST 洗涤 3 次, 每次 4 min; 选用 5% 脱脂奶粉 37  $^{\circ}$ C 分别封闭 60、90、120、150 min, 200  $\mu$ L  $\cdot$  孔<sup>-1</sup>, 同前洗涤; IBV 阴阳性血清分别作 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 倍比稀释, 100  $\mu$ L  $\cdot$  孔<sup>-1</sup>, 血清作用时间分别设定为 30、60、90、120、150 min, 同一样品作 3 个重复孔, 同时作一空白对照孔, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 同前洗涤; 接着加酶标二抗, 进行 1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000 和 1:5 000

稀释,  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 分别于  $37^\circ\text{C}$  反应 30、60、90、120、150 min, 同前洗涤; 继而加入可溶性单组分 TMB 底物溶液,  $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 避光反应, 反应时间分别设定为 5、10、15、20 min, 最后加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,  $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 。在酶标仪上测定  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值。采用方阵滴定法确定抗原的最适包被浓度、封闭时间、血清和酶标二抗的最佳稀释度和作用时间, 底物显色时间等。

**1.6.2 临界值的确定** 随机挑取 IBV 抗体阴性血清 20 份, 以优化的工作条件进行常规 ELISA 检测。根据统计学原则, 样本的  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值  $>$  阴性样本  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  平均值 ( $\bar{x}$ )  $+ 3 \times$  标准差 ( $s$ ) 时, 可以在 99.9% 的水平上判定为阳性。所以, 临界值 = 阴性血清平均  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值  $+ 3 \times$  标准差 ( $s$ )。

### 1.6.3 重复性试验

**1.6.3.1 批内重复性试验:** 用同一批制备的融合蛋白包被 1 块 ELISA 板, 在同一块酶标板内检测 5 份阳性血清, 每份血清设 4 个重复。计算其标准差 ( $s$ ) 和变异系数 (CV), 以检验批内样品的重复性。

**1.6.3.2 批间重复性试验:** 用同一批制备的融合蛋白包被 3 块 ELISA 板, 相同条件下分别在 3 块 ELISA 板内检测 5 份阳性血清, 每份血清设 4 个重复。计算其标准差 ( $s$ ) 和变异系数 (CV), 以检验批

间样品的重复性。

**1.6.4 敏感性试验** 将阳性血清作 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 300、1 : 400、1 : 500、1 : 600、1 : 700 稀释, 按已建立的 ELISA 方法进行检测, 确定该方法的敏感性。

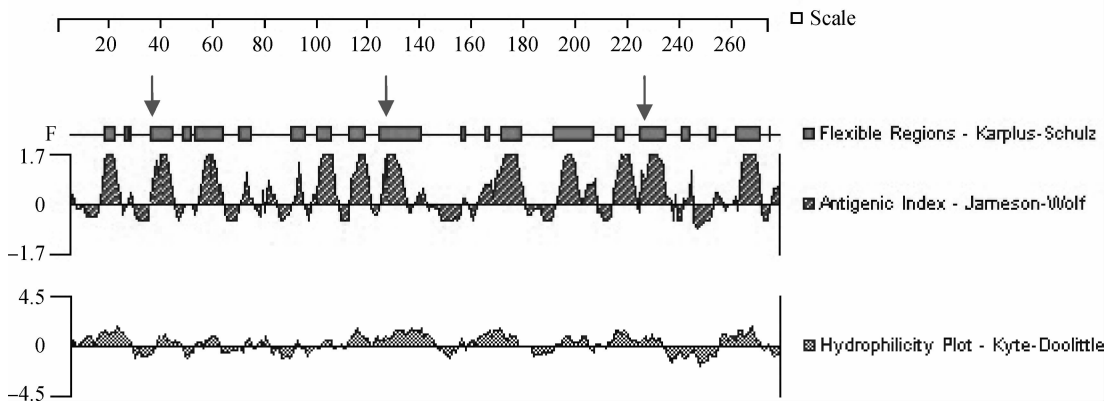
**1.6.5 特异性试验** 用建立的间接 ELISA 方法分别检测 AIV(H5)、AIV(H9)、NDV、IBDV 阳性血清, 同时设 IBV 阳性血清与阴性血清对照, 每个样品重复 3 次, 判断该方法有无交叉反应。

**1.6.6 ELISA 方法的应用** 用已建立的间接 ELISA 方法和美国 IDEXX 公司商品化的 ELISA 试剂盒对从四川乐山、眉山、雅安等鸡场采取的 175 份血清样品进行检测, 比较 2 种方法的符合率。

## 2 结果

### 2.1 串联基因 *F* 的生物信息学分析

用 DNASTar 软件分析构建的 IBV S1 蛋白串联基因 *F* 的生物信息特征。如图 1 所示, 串联基因 *F* 具有较强的亲水性和抗原性, 柔性区域分布较多, 并且由图可见在基因构建时人工添加的柔性连接肽处形成了柔性区, 表明嵌合基因构建成功。



红色箭头是添加的柔性肽

Position marked by arrows means artificially added Flexible peptide

图 1 构建的 IBV 多表位串联基因 *F* 的生物信息学分析

Fig. 1 The bioinformatics analysis of multi-epitope series gene *F* of IBV

### 2.2 IBV S1 蛋白多表位串联基因 *F* 的拼接结果

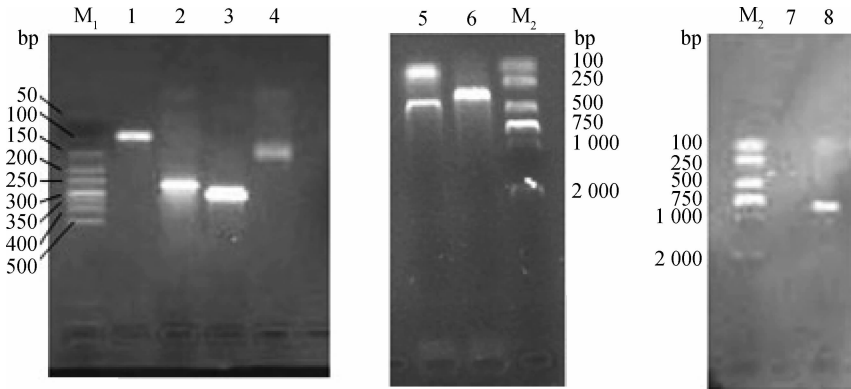
利用 4 对引物分别对 IBV ZY3 毒株 S1 蛋白的片段 *F*<sub>1</sub>、*F*<sub>2</sub>、*F*<sub>3</sub>、*F*<sub>4</sub> 进行 PCR 扩增, PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 结果均出现特异性条带, 片段大小分别为 93、276、324、138 bp, 其大小

与预期相符, 电泳图见图 2。

用表位 *F*<sub>1</sub> 与 *F*<sub>2</sub>、表位 *F*<sub>3</sub> 与 *F*<sub>4</sub> 的连接产物作为模板, 分别进行 PCR 扩增得到表位 *F*<sub>12</sub> 和 *F*<sub>34</sub>, 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 结果均出现特异性条带, 片段大小分别为 363、456 bp,

其大小都与预期相符,电泳图见图 2。表位 F12 与 F34 连接产物作模板,进行 PCR 扩增得到表位 F,扩增产物用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,结果

出现特异性条带,片段长度为 813 bp,电泳图见图 2。



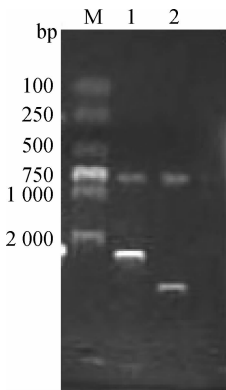
M<sub>1</sub>. 50 bp DNA Ladder 相对分子质量标准;M<sub>2</sub>. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. F1 扩增产物;2. F2 扩增产物;3. F3 扩增产物;4. F4 扩增产物;5. F34 扩增产物;6. F12 扩增产物;7. 阴性对照;8. F 扩增产物  
M<sub>1</sub>, 50 bp DNA Ladder marker; M<sub>2</sub>. DL2000 DNA marker; 1. F1 fragment; 2. F2 fragment; 3. F3 fragment; 4. F4 fragment; 5. F34 fragment; 6. F12 fragment; 7. Negative control; 8. intact tandem gene of F

图 2 IBV S1 蛋白抗原表位串联各步构建连接产物电泳图

Fig. 2 The splicing epitope fragments during the construction of tandem gene F of IBV

### 2.3 重组质粒的构建及序列分析

挑选白色菌落,以碱裂解法提取质粒,将提取的含目的片段的重组质粒 pMD19-T-F 和 pET-32a-F 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定。酶切产物在 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳观察,双酶切结果显示获得了 2 600 bp 的载体 pMD19-T、5 600 bp 的载体 pET-32a 和大小为 813 bp 的目的条带,与预期结果一致,电泳结果见图 3。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. *Bam*H I /*Xho* I 双酶切 pMD19-T-F;2. *Bam*H I /*Xho* I 双酶切 pET-32a-F

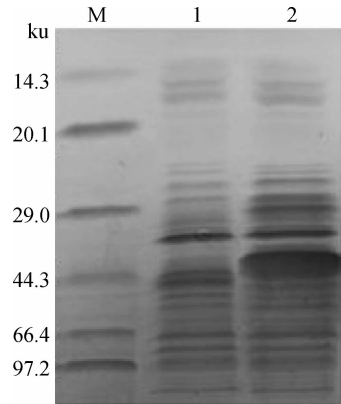
M. DL2000 DNA marker; 1. pMD19-T-F/*Bam*H I + *Xho* I; 2. pET-32a-F/*Bam*H I + *Xho* I

图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

### 2.4 串联蛋白的诱导表达及 Western blot 鉴定

SDS-PAGE 的结果显示(图 4),串联基因 F 在大肠杆菌中获得高效表达,相对分子质量为 42 ku,与预期结果一致。



M. 蛋白质相对分子质量标准(低);1. 未诱导的重组菌;2. 经 IPTG 诱导的重组菌

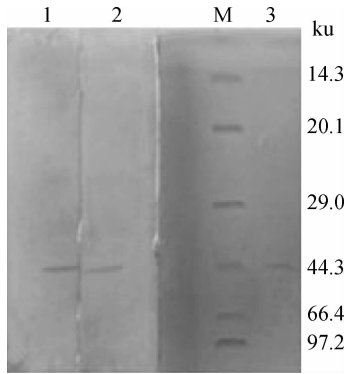
M. Lower molecular weight marker; 1. Positive recombinant pre-induction; 2. positive recombinant induced 4 hours

图 4 串联基因原核表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Identification of the prokaryotic expressed series protein by SDS-PAGE

Western blot 分析表明,表达的重组蛋白可以与 IBV 阳性血清发生反应(图 5)。多次试验结果表明串联表位 F 的表达量是比较稳定的,纯化的蛋白

不仅可以和 IBV ZY3 毒株阳性血清发生反应,也可以与 H52 毒株发生特异性反应,证明表达的串联蛋白 F 具有良好的反应原性。



M. 蛋白质相对分子质量标准(低);1. IBV H52 阳性血清免疫印迹;2. IBV ZY3 阳性血清免疫印迹;3. 纯化后重组蛋白

M. Lower molecular weight marker; 1. Identification of IBV H52 positive serum; 2. Identification of IBV ZY3 positive serum; 3. Purified recombinant protein

图 5 串联基因原核表达的 Western-blotting 鉴定

Fig. 5 Identification of the prokaryotic expressed series protein by Western-blotting

## 2.5 间接 ELISA 检测方法的建立

2.5.1 间接 ELISA 最佳工作条件的确定 方阵试验的结果显示,当抗原浓度为  $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,血清稀释倍数为 1:160 时,P/N 值较大,且阳性血清的  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值接近 1.0,故蛋白的最佳包被浓度为  $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,血清最佳稀释比为 1:160。血清最佳反应时间为 1 h,酶标二抗最佳工作浓度为 1:2 000,反应条件为  $37^\circ\text{C}$  60 min,底物  $37^\circ\text{C}$  显色 10 min。

2.5.2 临界值的确定 按照已建立的间接 ELISA 方法检测 20 份鸡阴性血清,测定其  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值。20 份血清中  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  最大值为 0.305,最小值为 0.148,平均值( $\bar{x}$ )为 0.248,标准差( $s$ )为 0.038。因此,间接 ELISA 方法的临界值为  $0.258 + 3 \times 0.038 = 0.363$ ,确定当样本  $\text{OD}_{450 \text{ nm}} \geq 0.363$  时判定为阳性; $\text{OD}_{450 \text{ nm}} < 0.363$  时判定为阴性。

表 3 特异性试验结果

Table 3 The result of specificity test

	禽流感 H5 AIV H5	禽流感 H9 AIV H9	新城疫 NDV	传染性法氏囊 IBDV	阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control
$\text{OD}_{450 \text{ nm}}$	0.232	0.249	0.269	0.275	0.918	0.225
判定结果 Result	—	—	—	—		

2.5.3 重复性试验 重复性试验结果显示,5 份阳性血清的批内 CV 最小值为 3.32%,最大值为 6.56%,而批间 CV 最小值为 5.34%,最大值为 9.61%,均小于 10%(表 2),表明建立的间接 ELISA 方法具有良好的重复性。

2.5.4 敏感性试验 IBV 阳性血清从 1:50 倍开始稀释进行间接 ELISA 检测,当血清稀释至 1:500 时,测得的  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值为 0.374(图 6),说明仍能检测到 IBV 抗体,证明建立的方法具有较好的敏感。

表 2 板内、板间重复性试验结果( $n=5$ )

Table 2 The result of repeatability in the same and different microplates ( $n=5$ )

	1	2	3	4	5
批内变异系数 Intro-batch	3.32	4.96	4.92	6.56	5.71
批间变异系数 Inter-batch	7.57	5.34	5.70	9.61	8.16

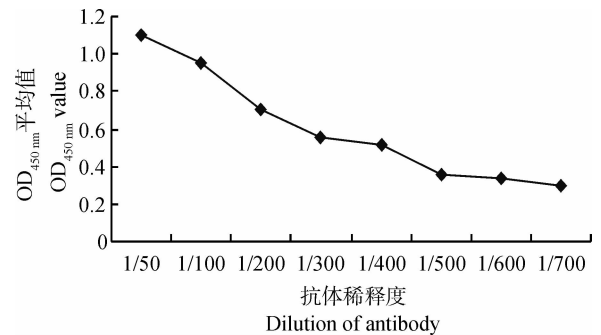


图 6 敏感性试验

Fig. 6 Sensitivity Test

2.5.5 特异性试验 串联蛋白作为 ELISA 包被抗原与其他 4 种鸡常见的传染病阳性血清发生反应,测其  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值均小于 0.363,均为阴性(表 3),表明串联蛋白针对 IBV 阳性血清具有良好的特异性,可以作为 ELISA 包被抗原用于 IBV 抗体的检测。

2.5.6 与试剂盒的符合率试验 用建立的 ELISA 方法与 IDEXX IBV 抗体试剂盒平行检测 175 份送检血清,与 IDEXX 试剂盒检测的阳性符合

率为 90.2%(139/154),阴性符合率为 85.7%(18/21),总体符合率为 89.7% [(139+18)/175],见表 4。

表 4 ELISA 检测方法与试剂盒检测结果的比较

Table 4 Comparison of the results between the established ELISA and Commercial kit

检测结果 The results	IDEXX	ELISA 试剂盒	Commercial kit	ELISA 检测结果		The results of established ELISA	
	血清数	Serum counts		阳性数	Positive counts	阴性数	Negative counts
阳性 Positive		154		139		3	
阴性 Negative		21		15		18	
合计 Total		175		154		21	

### 3 讨论

IBV 为典型的冠状病毒,主要结构蛋白有 S、N 和 M 蛋白 3 种。其中 M 蛋白的作用主要与病毒的复制有关,其免疫原性比较弱且不能诱导产生免疫保护性作用;N 蛋白和 S 蛋白均可用作检测 IBV 特异性抗体的抗原。最终作者选择 S1 蛋白作为研究对象,主要有两方面的原因:一方面,S1 蛋白的抗体水平能够反映机体免疫状况,可作为评价疫苗免疫效果的指标,同时也可以用来检测雏鸡体内母源抗体,为确定适当的免疫时间提供依据<sup>[12-14]</sup>;另一方面,近年的研究结果表明,N 蛋白虽能诱导机体产生高水平抗体,但其不是主要保护性抗原,抗体水平并不代表中和抗体水平和保护性抗体水平。

由于  $\beta$ -折叠和  $\alpha$ -螺旋的化学键较高,结构规则较稳定,不容易变形,较难嵌合抗体,所以一般不作为抗原表位的首选区域<sup>[15]</sup>,因此在筛选抗原表位区时应避开  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠区序列。另外在筛选抗原表位时,不仅要选择具有免疫优势的表位,同时尽可能包含不同毒株间相对保守的表位,期望能同时检测出不同毒株产生的 IBV 抗体,结果表明,纯化的串联蛋白与鸡抗 IBV H120 和 H52 阳性血清进行 Western blot 分析均能发生特异性反应,这就为后期的研究奠定了基础。

把 4 个表位直接串连成 1 条新基因的难度较高,在做预试验时也尝试过直接连接,但由于保守性、连接效率等因素的影响均未连接成功。所以最后本试验采用分步克隆、连接和再克隆的方法串连 4 个抗原表位。由于 PCR 扩增过程中酶的保真性有限,一些碱基可能会发生突变或缺失,所以试验过

程中每一步骤的克隆及其测序都非常重要,其目的主要是保证每一次的串联都正确,不会出现碱基突变或缺失的现象。

串联表达技术有其自身的优点和特殊性,将抗原表位进行串联既纯化了抗原性,又减少了无关干扰序列的影响。近年来,表位串联这种手段已经广泛应用于诊断抗原、免疫原的制备<sup>[16-17]</sup>。本研究根据重复多次的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,结果表明串联蛋白表达量高且稳定、抗原性良好,用纯化的串联蛋白作为包被抗原,通过一系列优化试验,建立了检测 IBV 抗体的间接 ELISA 方法,并与 IDEXX 公司的 IBV 检测试剂盒进行了对比,符合率到达 89.5%,与其他常见的 4 种鸡病的阳性血清反应无交叉反应。试验结果说明建立的 ELISA 检测方法可行且具有良好的重复性、敏感性和特异性,显示了良好的应用前景,为鸡传染性支气管炎的检测提供了一种快速、简便的手段。

### 参考文献:

- [1] 王红宁. 禽传染性支气管炎综合防治[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2000.
- [2] HISCOX J A, WURM T, WILSON L, et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus[J]. *J Virol*, 2001, 75(1): 506.
- [3] MOLENKAMP R, SPAAN W J M. Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal[J]. *Virology*, 1997, 239(1): 78-86.
- [4] 刘胜旺. 我国鸡传染性支气管炎流行现状及原因分析[J]. 中国家禽, 2010, 32(16): 5-9.

- [5] CAVANAGH D, DAVIS P J, MOCKETT A P. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes [J]. *Virus Res*, 1988, 11(2):141-150.
- [6] KOCH G, KANT A. Nucleotide and amino acid sequence of the S1 subunit of the spike glycoprotein of avian infectious bronchitis virus, strain D3896 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(10):3063.
- [7] 徐 辉, LOHR J. 检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的三种血清学方法的比较[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(3):168-170.
- [8] 磨美兰, 李 孟, 韦正吉, 等. 广西 1985 年~2008 年 IBV 分离株 S1 基因高变区 I 和 N 基因的序列和系统进化分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, (10): 761-765.
- [9] ZOU N L, ZHAO F F, WANG Y P, et al. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China [J]. *Virus Gen*, 2010, 41(2): 202-209.
- [10] 田 浪. 禽传染性支气管炎病毒多表位嵌合 DNA 疫苗构建及免疫研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2009.
- [11] HAN Z, SUN C, YAN B, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(1):190-200.
- [12] 王新卫, 郝春丽, 何宏轩, 等. IBV NP 基因的可溶性表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2009, 6:700-704.
- [13] 宋翥远, 卿上田, 肖朝庭, 等. 传染性支气管炎病毒结构蛋白研究进展 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(6): 100-102.
- [14] GOMAA M H, YOO D, OJKIC D, et al. Use of recombinant S1 spike polypeptide to develop a TCoV-specific antibody ELISA [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 138(3-4): 281-288.
- [15] 阎隆飞, 孙之荣, 蛋白质分子结构 [M]. 北京:清华大学出版社, 1999.
- [16] 贾 莹, 李 岩, 尹 鑫, 等. 牛病毒性腹泻病病毒 NS3 表位串联蛋白表达及抗体间接 ELISA 方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8):1120-1125.
- [17] 钱莺娟. 串联表达 GA 株 MDV gB 主要表位基因重组鸡痘病毒的构建及其免疫保护作用 [D]. 南京:南京农业大学, 2003.

(编辑 白永平)