

小反刍兽疫病毒 N 基因重组杆状病毒的构建及间接 ELISA 抗体检测方法的建立

李 伟¹, 李 刚^{1*}, 吴晓东², 邱文英¹, 张 坤¹, Hermann Unger³

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物分子营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 中国动物卫生与流行病学中心外来病诊断中心, 青岛 266032;

3. FAO/IAEA 农业生物技术实验室, Seibersdorf 奥地利)

摘要: 本研究旨在建立基于真核表达的小反刍兽疫病毒(PPRV) N 蛋白的诊断小反刍兽疫的间接 ELISA 方法。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒-昆虫表达系统, 构建含有 PPRV N 基因的重组供体质粒 pFastBacHTA-N, 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 得到重组穿梭质粒 pBacmid-PPRV-V, 转染昆虫细胞 Sf21, 获得含有 PPRV N 基因的重组杆状病毒。用重组病毒感染昆虫细胞后, SDS-PAGE 鉴定出 60 ku 左右的表达蛋白, Western blot 检测该蛋白具有很好的反应原性。以重组 Bacmid-PPRV-N 蛋白作为包被抗原, 建立间接 ELISA 检测方法。临床检测来自西藏疫区的 37 份山羊血清和来自青海省非疫区的 92 份山羊血清, 与法国蒙彼利埃农学发展研究国际合作中心(CIRAD-EMVT)提供的竞争 ELISA 试剂盒相比较, 特异性为 96.2%, 敏感性为 100%, 二者的符合率达到 96.9%。结果表明本研究建立的间接 ELISA 方法可以很好地用于小反刍兽疫的临床诊断。

关键词: 小反刍兽疫病毒; 杆状病毒; 昆虫细胞; 间接 ELISA

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)09-1147-07

Construction of Recombinant Baculovirus Containing Peste des Petitis Ruminants Virus N Gene and Establishment of Indirect ELISA for Detecting the Serum Antibody

LI Wei¹, LI Gang^{1*}, WU Xiao-dong², QIU Wen-ying¹, ZHANG Kun¹, Hermann Unger³

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. National Exotic Animal Disease Center, China Animal Health & Epidemiology Center,

Qingdao 266032, China; 3. FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Austria)

Abstract: This experiment was conducted to diagnose Peste des Petitis Ruminants based on the eukaryo-expressed PPRV nucleoprotein through indirect ELISA. The full-length PPRV nucleoprotein gene was obtained from viral genome RNA by RT-PCR. The amplified fragments were cloned into baculovirus donor vectors pFastHTA of Bac-to-Bac system. These recombinant plasmids, pFastHTA-PPRV-N, were transformed into DH10Bac host bacteria to get recombinant shuttle plasmids, pBacmid-PPRV-N. Recombinant baculovirus, Bacmid-PPRV-N, was generated for expressing PPRV nucleoprotein by transfecting recombinant pBacmid-PPRV-N with LipofectAMINE 2000 into Sf21 insect cells. PPRV nucleoprotein which efficiently expressed by bacu-

收稿日期: 2010-03-07

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)(2008AA10Z411); “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD06A13-4); “948”项目(2007-G57-C); FAO/IAEA 项目(14515-0, R1)

作者简介: 李 伟(1984-), 女, 山东新泰人, 硕士生, 主要从事动物重大疫病的诊断与防控研究, E-mail: lw.sdu@163.com

* 通讯作者: 李 刚, E-mail: gli358@gmail.com

lovirus in Sf21 cells was verified by SDS-PAGE and Western blot. Furthermore, indirect ELISA was developed using recombinant PPRV nucleoprotein as coating antigen. 37 goats' sera from epidemic area in Tibet Autonomous Region and 92 goats' sera from non-infected area in Qinghai Province were detected by indirect ELISA and international standard cELISA kit simultaneously. The sensitivity and specificity of indirect ELISA were 100% and 96.2% compared with cELISA kit. The coincidence rate of the two methods was 96.9%. The results demonstrated that the indirect ELISA established in this study works well in the PPR diagnosis.

Key words: Peste des Petitis Ruminants Virus; baculovirus; insect cells; indirect ELISA

作为一种外来动物疫病,小反刍兽疫(Peste des Petitis Ruminants, PPR)^[1-2]近年来在我国周边国家频繁大规模暴发,土耳其、印度、尼泊尔、俄罗斯等国均有发生,对我国边境及内陆畜牧业构成严重威胁^[3-6]。2007年7月,我国西藏阿里地区部分边境县、乡发生了小反刍兽疫疫情,成为我国首先被此病入侵的地区,疫情已引起了我国的高度重视^[6-8]。小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒(Peste des Petitis Ruminants Virus, PPRV)引起的一种急性、热性、接触性传染病,是世界动物卫生组织(OIE)规定的必须上报的传染病,在我国被列为一类动物疫病,具有高发病率和高死亡率等特点。PPRV是副黏病毒科(Paramyxovirus)麻疹病毒属(*Morbillivirus*)成员^[9]。PPRV基因组共编码6种结构蛋白,即核蛋白(N)、磷蛋白(P)、多聚酶大蛋白(L)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)和血凝素蛋白(H)。N蛋白由N基因翻译,PPRV Nigeria 75/1株的N ORF编码的蛋白含有525个氨基酸,估计相对分子质量为58 ku^[10]。本研究利用杆状病毒-昆虫表达系统成功表达了PPRV的N蛋白,并将此蛋白纯化后作为包被抗原,建立了检测PPRV血清抗体的间接ELISA检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

小反刍兽疫病毒疫苗株 Nigeria75/1,为作者实验室保存;RNA提取试剂盒购自大连宝生物公司;AMV反转录酶购自 Promega 公司;pFastBacHTA载体由北京市农林科学院畜牧兽医研究所刘爵老师馈赠;T4 DNA连接酶为大连宝生物工程有限公司产品;DH10Bac菌种和 LipofectAMINE 2000转染试剂购自 Invitrogen 公司;Sf21由中国科学院微生物研究所馈赠;抗His标签的鼠源单克隆抗体、羊抗鼠 IgG-HRP、兔抗山羊 IgG-HRP均购自中杉金桥

生物试剂有限公司;疫区临床血清样本由国家外来动物疫病诊断中心保存;山羊口蹄疫阳性血清,山羊痘阳性血清,92份非疫区山羊血清均由青海省德令哈市疾病预防控制中心馈赠;山羊牛瘟高免血清由中国兽医药品监察所支海兵老师馈赠;羊包虫病阳性血清由作者实验室保存;TMB底物显色溶液购自北京天根生物技术有限公司;Ni-琼脂糖凝胶蛋白纯化柱购自北京韦氏博慧色谱科技公司;竞争性ELISA试剂盒购自法国蒙彼利埃的农学发展研究国际合作中心(CIRAD-EMVT)^[11]。

1.2 目的基因的扩增

使用 TaKaRa Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 3.0试剂盒,按照说明书从250 μ L PPRV细胞培养液中提取病毒总RNA,最后溶于30 μ L Elution Buffer中,加入1 μ L RNA酶抑制剂(20 U),-80 $^{\circ}$ C冰箱中储存备用。以得到的RNA为模板,使用AMV反转录酶,42 $^{\circ}$ C 30 min反转录为cDNA。根据NCBI公布的PPRV Nigeria75/1的全基因组序列(GenBank登录号: X74443),设计引物扩增全长N基因,分别在N基因的上游和下游分别引入EcoR I和Not I酶切位点,上下游引物分别命名为Nup和Nlp,并由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列如下,Nup: 5'-CTGGAATTCATGCTCTCCTAAAG-3'; Nlp: 5'-GTTGCGCCGCTCAGCTGAGGAGATCCTTGT-3'。

PCR程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。1%的Agarose凝胶电泳,紫外凝胶成像系统下观察结果。

1.3 重组供体质粒(donor plasmid)pFastBacHTA-N的构建

PPRV N基因PCR扩增片段经EcoR I和Not I双酶切后克隆至pFastBacHTA载体中。获得重组供体质粒pFastBacHTA-N,EcoR I和Not I双

酶切鉴定,并送上海生工生物技术有限公司测序。

1.4 重组穿梭质粒的构建

pFastBacHTA-N 质粒按照常规程序转化 DH10Bac *E. coli* 感受态细胞之后,加入室温下的 500 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 5 h,取 10 μL 菌液稀释至 100 μL ,涂布于 LB 平板上(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Bluo-gal、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IPTG),37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置平板培养 48 h,挑白色菌落重新划线于上述含有 3 种抗生素的 LB 平板上,白色菌落为可能已发生重组的菌落。

1.5 重组穿梭质粒的提取及鉴定

在重新划线平板上挑取白色菌落接种于 LB 培养基中(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素)。37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜,提取重组穿梭质粒。具体方法参见 Bac-to-Bac 操作手册。以此重组穿梭质粒为模板,使用引物 M13F 和 M13R、M13F 和 N1p 进行 PCR,鉴定是否有外源基因插入。

1.6 重组穿梭质粒转染 Sf21 细胞

将 Sf21 细胞培养在 35 mm 细胞培养板中,得到正确重组的穿梭质粒之后,即用脂质体法转染 Sf21 细胞,同时使用 DH10Bac 的质粒转染 Sf21 作为阴性对照,具体方法参见 LipofectAMINE 2000 试剂说明。转染后 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,次日换液,继续培养 72~120 h。收集培养上清,500 g 离心 10 min,上清为病毒原种,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将此病毒原种重新感染 Sf21 细胞,3 d 后离心收集细胞上清,即为 P2 代病毒,P2 代病毒滴定后 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,可以用来感染新的细胞。

1.7 重组病毒的 SDS-PAGE 鉴定

取适量 P2 代重组杆状病毒感染 Sf21 细胞,使 MOI 达到 1~5,将感染 72 h 的 Sf21 细胞 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,细胞沉淀用细胞裂解液重悬(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,2% TritonX-100,pH 8.0),SDS-PAGE 分析重组蛋白 Bacmid-PPRV-N 的表达情况。

1.8 Western blot 鉴定重组蛋白的抗原性

SDS-PAGE 凝胶转膜后,使用抗 His 标签的鼠源单克隆抗体(1:1 000 倍稀释)和 PPR 阳性血清(1:500 倍稀释)进行鉴定,二抗分别使用羊抗鼠 IgG-HRP(1:1 000 倍稀释)和兔抗山羊 IgG-HRP(1:1 000 倍稀释)。

1.9 间接 ELISA 方法的建立

1.9.1 抗原 Bacmid-PPRV-N 蛋白包被浓度及血清稀释度的确定 使用 Ni-琼脂糖凝胶蛋白纯化柱对细胞破碎后的上清进行纯化。用方阵滴定法对抗原和血清进行梯度稀释,根据 P、N 值及 P/N 值的大小确定 Bacmid-PPRV-N 蛋白的最佳包被浓度及血清的最佳稀释度。

1.9.2 其他 ELISA 条件的优化 分别对封闭液、封闭时间、血清反应时间、酶标抗体(兔抗山羊 IgG-HRP)的工作浓度、酶标抗体的作用时间及显色底物作用时间等反应条件进行优化。

1.10 Cut-off 值及阴阳性标准的确定

将 60 份 PPRV 阴性山羊血清按照间接 ELISA 确定的优化方法进行检测,计算出 OD_{450 nm} 的算术平均值,计算 Cut-off 值,确定阴阳性样本的判定标准。

1.11 检测方法的批内、批间重复性的评价

取 3 份山羊阳性血清,每一份血清设置 6 个重复,在最佳反应条件下,计算检测到的 OD_{450 nm} 的平均值及标准差,根据变异系数来评价批内的可重复性。分别选择 3 次不同时间,以及不同批次纯化的蛋白对 1 份阳性血清进行检测,然后计算平均值及标准差,根据变异系数来评价批间的可重复性。

1.12 间接 ELISA 检测方法的特异性评价

用建立的间接 ELISA 方法,分别对 OIE 标准 PPR 阳性血清、山羊 PPR 阴性血清、山羊 PPR 阳性血清、牛瘟山羊高免血清、山羊口蹄疫阳性血清、山羊痘阳性血清、羊包虫病阳性血清进行检测,每个血清样品设置 3 个重复,判定间接 ELISA 检测方法的特异性。

1.13 临床检测的符合率试验

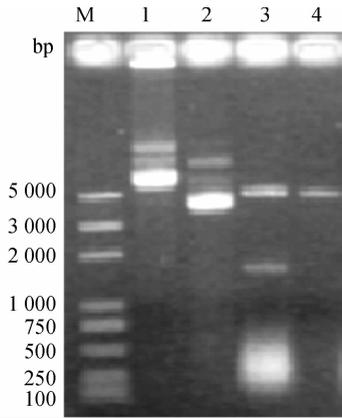
用建立的间接 ELISA 方法和竞争性 ELISA 检测试剂盒(由 Libeau G 等在 1995 年构建)对从西藏疫区采集的 37 例山羊血清和从青海省德令哈市采集的 92 例山羊血清同时进行检测,计算二者检测的阳性率和符合率。

2 结 果

2.1 重组供体质粒 pFastBacHTA-N 的鉴定

pFastBacHTA-N 双酶切后可以在 5 000 和 1 600 bp 处看到 2 条带,而空的 pFastBacHTA 载体只酶切得到 1 条带,与预期的大小相符(图 1),测序结果证实目的片段大小及阅读框序列正确,证明

PPRV N 基因已经成功克隆至载体 pFast-BacHTA。



M. DL2000 plus DNA 相对分子质量标准; 1. pFast-BacHTA-N; 2. pFastBacHTA; 3. pFastBacHTA-N 经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切; 4. pFastBacHTA 经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切

M. Marker DL2000 plus; 1. Plasmid pFastBacHTA-N; 2. Plasmid pFastBacHTA; 3. Restriction enzyme identification of recombinant plasmid pFastBacHTA-N by *EcoR* I and *Not* I; 4. Restriction enzyme identification of control plasmid pFastBacHTA by *EcoR* I and *Not* I

图 1 pFastBacHTA-N 的酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid pFast-BacHTA-N by enzyme digestion

2.2 重组 pBacmid-PPRV-N 质粒的 PCR 鉴定

使用引物 M13F 和 M13R PCR 得到 4 000 bp 左右的条带,引物 M13F 和 N1p PCR 得到 3 000 bp 左右的条带,与理论预测值相符(图 2),证明 pFast-BacHTA-N 与 Bacmid 已发生正确重组, pBacmid-PPRV-N 重组质粒构建成功。

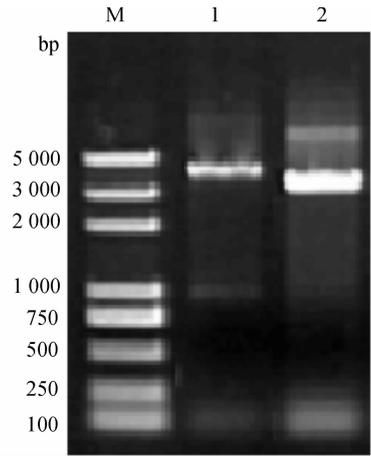
2.3 重组病毒的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

收集重组 pBacmid-PPRV-N 质粒转染后的 Sf21 细胞经 SDS-PAGE 电泳后,转移到 NC 膜上进行 Western blot 鉴定,检测重组蛋白对 His 单克隆抗体和 PPR 血清抗体的反应性,结果显示在 60 ku 处有清晰的反应条带(图 3B,第 2 泳道),而 DH10Bac 质粒转染 Sf21 得到的野生型杆状病毒并无此反应条带(图 3B,第 1 泳道),证明重组病毒构建成功且能正确表达融合蛋白 Bacmid-PPRV-N。

2.4 间接 ELISA 抗体检测方法的优化结果

2.4.1 抗原包被浓度及血清稀释度的确定 当阳性血清 OD_{450 nm} 值 1.0 左右,阴性血清 OD_{450 nm} 值在 0.1 以下,且 P/N 比值越高,检测方法的灵敏度

越高。因此本试验确定抗原的最佳包被浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,血清的最佳稀释度为 1 : 300。

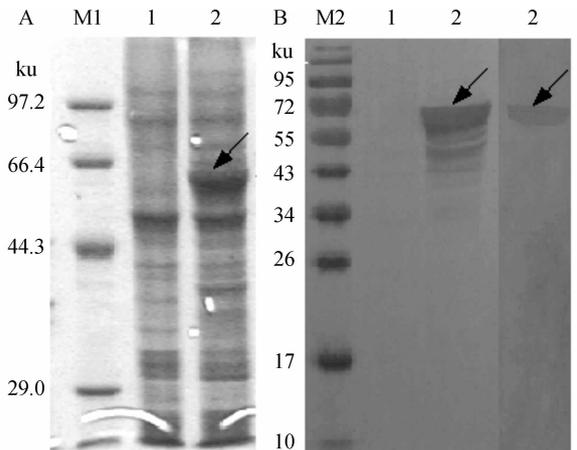


M. DL2000 plus DNA 相对分子质量标准; 1. 引物 M13F 和 M13R 的 PCR 产物; 2. 引物 M13F 和 N1p 的 PCR 产物

M. Marker DL2000 plus; 1. PCR products of recombinant plasmid pBacmid-PPRV-N with M13F and M13R primers; 2. PCR products of recombinant plasmid pBacmid-PPRV-N with M13F and N1p primers

图 2 重组质粒 pBacmid-PPRV-N 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pBacmid-PPRV-N by PCR



M1. 蛋白低相对分子质量标准; M2. 蛋白高相对分子质量标准; 1. 野生杆状病毒感染 Sf21 细胞; 2. 重组病毒感染的 Sf21 细胞

M1. Low molecular weight prestained protein marker; M2. High molecular weight prestained protein marker; 1. Sf21 cell infected by wild baculovirus; 2. Sf21 cells infected by recombinant baculovirus

图 3 重组病毒的 SDS-PAGE (A) 以及 Western blot (B) 鉴定

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the recombinant baculovirus

2.4.2 其他 ELISA 条件的确定 最佳封闭条件为用含 10% 的牛血清的 PBST 37 °C 封闭 2 h; 待检血清用含 10% 牛血清的 PBST 稀释, 37 °C 作用 30 min; 兔抗山羊 IgG-HRP 用含 10% 牛血清的 PBST 做 1:2 000 倍稀释, 37 °C 作用 30 min, TMB 底物显色条件为 37 °C 反应 15 min。

2.5 Cut-off 值及阴阳性判定标准的确定

对 60 份山羊阴性血清进行间接 ELISA 检测, 阴性血清的平均值 \bar{x} 为 0.144, 标准差 s 为 0.055, 其置信区间上限 Cut-off 值 $= \bar{x} + 3s = 0.309$, 下限 Cut-off 值 $= \bar{x} + 2s = 0.254$, 由此根据间接 ELISA 判定标准^[12], 样本 OD_{450 nm} 值 ≥ 0.309 时判定为阳

性, OD_{450 nm} 值 ≤ 0.254 时判定为阴性, 介于二者之间判定为可疑, 进行重新检测, 若仍小于 0.309, 则判定为阴性。

2.6 批内及批间重复性检测结果

批内重复性试验结果见表 1。统计分析结果显示变异系数在 4.55%~8.64%, 低于 10%, 表明同一批 Bacmid-PPRV-N 蛋白具有较好的稳定性, 间接 ELISA 试验批内重复性良好。

批间重复性检测结果见表 2。统计分析结果显示变异系数为 8.22%, 小于 10%, 表明批间重复性良好, 抗原的纯化和储存方法较合适。

表 1 批内重复试验结果

Table 1 Result of intro-batch duplicability test

样品 Sample	重复孔的 OD _{450 nm} 值 Duplications' OD _{450nm} values						OD _{450 nm} 均值 \bar{x} OD _{450 nm} mean value \bar{x}	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
	1	2	3	4	5	6			
	1	1.41	1.45	1.39	1.42	1.36			
2	1.50	1.56	1.53	1.53	1.52	1.59	1.54	0.07	4.55
3	0.86	0.82	0.86	0.90	0.91	0.87	0.87	0.07	8.64

表 2 批间重复试验结果

Table 2 Result of inter-batch duplicability test

样品 Sample	OD _{450 nm} 批次均值 OD _{450nm} mean values of batches				OD _{450 nm} 均值 \bar{x} OD _{450 nm} mean Value \bar{x}	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
	1	2	3	4			
	1	1.41	1.53	1.39			

2.7 间接 ELISA 特异性试验

间接 ELISA 检测结果显示, 山羊口蹄疫阳性血清、山羊痘阳性血清和羊包虫阳性血清都为阴性, 表明 Bacmid-PPRV-N 蛋白与这 3 种血清无交叉反应。OIE 标准 PPR 阳性血清、山羊 PPR 阳性血清和山羊牛瘟高免血清检测为阳性(图 4)。证明此间接 ELISA 方法能检测出山羊 PPRV 和牛瘟病毒(RPV)的血清抗体。

2.8 临床检测的符合率试验

对来自西藏疫区的 37 份山羊血清和青海省德令哈市的 92 份山羊血清用建立的间接 ELISA 方法和竞争 ELISA 试剂盒进行平行检测, 间接 ELISA 检测出的阳性样品占 28 份, 阳性率为 21.7%, 比竞

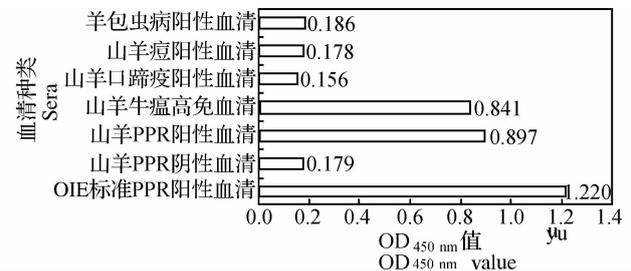


图 4 间接 ELISA 的特异性试验

Fig. 4 The Specificity of indirect ELISA

争性 ELISA 高。以竞争 ELISA 检测出的阳性和阴性作为真实的阳性和阴性, 则间接 ELISA 的敏感性为 100%, 特异性为 96.2%, 间接 ELISA 和竞争 ELISA 检测结果的符合率为 96.9%(表 3)。

表 3 间接 ELISA 与竞争 ELISA 试剂盒检测结果比较

Table 3 Comparative test of indirect ELISA and cELISA

检测方法	阳性结果	阴性结果	阳性率/%	符合率/%
Detecting method	Positive / Total	Negative / Total	Positive rate	Coincident rate
间接 ELISA	28/129	101/129	21.7	96.9
竞争 ELISA	24/129	105/129	18.6	

3 讨论

控制小反刍兽疫的最有效方法就是及时的预防免疫,现在常以 Vero 细胞培养的 Nigeria75/1 弱病毒株接种动物使之产生保护性抗体以抵御野生型病毒的攻击^[13-14]。本研究利用杆状病毒-昆虫表达系统成功表达了小反刍兽疫病毒的 N 蛋白,为构建重组的基因工程疫苗的研制奠定了基础。N 蛋白是 PPRV 中含量最丰富和免疫原性最强的病毒蛋白。其主要作用是保护病毒免受核糖核酸酶 I (RNase I) 的降解,并与 RNA 结合参与病毒的转录和翻译过程。N 蛋白的抗原性稳定,在病毒感染的动物血清中针对 N 蛋白的抗体占主导地位,但是此类抗体不具有中和病毒的作用^[14-15]。PPRV 和 RPV 同属于麻疹病毒属 (*Morbollivirus*) 成员,都能感染小反刍兽类,PPRV 与 RPV 的 N 基因核苷酸有 65.8% 的同源性,且二者含有共同的抗原表位,所以针对 PPRV 的阳性血清极易与 RPV 的阳性血清产生交叉反应。人们曾经使用牛瘟疫苗来预防 PPR,但是因为它能产生针对牛瘟病毒的抗体,从而影响牛瘟的血清监测和全球牛瘟消灭计划而被禁止。用抗 PPRV-N 蛋白特异性表位的单抗可以区别 RPV 和 PPRV,从而进行鉴别诊断^[16-17],作者实验室也在探索制备针对 PPRV-N 蛋白的单克隆抗体,从中筛选得到针对 PPRV-N 蛋白特异性表位的单抗细胞株,用于与牛瘟以及麻疹病毒属其他成员的鉴别诊断。由于人类已经在全球范围内彻底根除了牛瘟,因此使用本研究中构建的重组 Bacmid-PPRV-N 蛋白做间接 ELISA 的包被抗原,可以较好地诊断出抗 PPRV-N 蛋白的血清抗体,使得 PPRV 的诊断和防治更为方便^[18]。

杆状病毒的基因组为单一闭合环状双链 DNA 分子,为 80~160 kb,其基因组可在昆虫细胞核内复制和转录。DNA 复制后组装在杆状病毒的核衣壳内,后者具有较大的柔韧性,可以容纳较大片段的外源 DNA 插入,因此是表达大片段 DNA 的理想载

体^[19-20]。重组杆状病毒感染昆虫细胞后,在昆虫细胞内可以对外源蛋白进行许多真核细胞的转录后加工,包括糖基化、磷酸化、酰基化、正确的信号肽切割、蛋白水解以及适当的折叠作用,而且还可将重组蛋白聚集定位于天然蛋白的同一细胞器上,进行适当的寡聚化装配,因此也是表达有生物活性的可溶性蛋白质的理想载体。本研究采用杆状病毒昆虫表达系统表达 PPRV N 蛋白,旨在得到更接近于天然构象且能最大限度保存蛋白抗原表位的重组蛋白质。

国际上检测小反刍兽疫病毒的试剂盒价格昂贵,对于小型农场和市县动物疾病控制中心并不适用,本研究中作者利用真核表达的重组 Bacmid-PPRV-N 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法,成本低廉,操作简便,对实验条件要求不高,不需要无菌条件,且自动化程度相对较高,在大规模样品检测中有很大优势^[21]。对 37 份疫区山羊血清和 92 份非疫区山羊血清进行检测,并与 CIRAD-EMVT 提供的竞争性 ELISA 试剂盒做比较,二者的符合率达到 96.2%,且间接 ELISA 检测出的阳性率更高,证明其具有更高的敏感性。

4 结论

本研究表明使用 Bacmid-PPRV-N 重组蛋白作为检测抗原,具有较好的敏感性和特异性,在检测病毒感染及免疫效果的评价中有很高的应用价值。

参考文献:

- [1] GARGADENNEC L, LALANNE A. La peste des petits ruminants [J]. *Bulletin des Services Zoo Techniques des Epizooties de l' Afrique Occidentale Francaise*, 1942, (5): 16-21.
- [2] 刘佩红,沈素芳,黄忠. 动物外来疫病—小反刍兽疫防控技术研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2008, (6): 14-15.
- [3] 信爱国,杨仁标,向文彬. 小反刍兽疫研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(2): 152-155.

- [4] 蒋 梅,杨仕标,张念祖. 小反刍兽疫的流行趋势与防控[J]. 动物医学进展,2007,28(B08): 88-91.
- [5] 王志亮,包静月,吴晓东,等. 我国首例小反刍兽疫诊断报告[J]. 中国动物检疫,2007,24(8):24-26.
- [6] 李 刚,江彦增,晁生玉,等. 小反刍兽疫快速诊断技术及其疫苗的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(5):81-84.
- [7] 陆则基,王志亮,刘雨田,等. 西藏阿里地区小反刍兽疫流行病学调查研究[J]. 中国动物检疫,2008,25(12):44-47.
- [8] 陆则基,赵文姬,南文金,等. 小反刍兽疫——一种家养和野生小反刍动物的瘟疫[J]. 中国动物检疫,2008,25(11):48-50.
- [9] 哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 田晓灵,赵永刚,包静月,等. 小反刍兽疫病毒 N、H 和 F 蛋白的真核表达[J]. 中国动物检疫,2009,26(8):31-34.
- [11] LIBEAU G, PREHAUD C, LANCELOT R, et al. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein[J]. *Res Vet Sci*, 1995, 58: 50-55.
- [12] 李海燕,于康震. 间接酶联免疫吸附试验检测禽流感抗体的最佳工作条件[J]. 中国预防兽医学报,1998,20(4):233-235.
- [13] DIALLO A. Control of peste des petits ruminants; classical and new generation vaccines[J]. *Dev Biol (Basel)*, 2003, 114: 113-119.
- [14] BALAMURUGAN V, SEN A, SARAYANAN P, et al. Development and characterization of a stable vero cell; ine constitutively expressing Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) hemagglutinin protein and its potential use as antigen in Enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance of PPRV[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13: 1367-1372.
- [15] MEYER G, DIALLO A. The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: The long untranslated region in the 5' end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus[J]. *Virus Research*, 1995, 37:23-38.
- [16] DIALLO A, BARRETT T, BARBORN M. Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste des petits ruminants virus; relationship to other morbilliviruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(11): 233-237.
- [17] DIALLO A, BARRETT T, BARBORN M. Differentiation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using specific cDNA clones [J]. *J Virol Methods*, 1989, 23(2): 127-136.
- [18] ISMAIL T M, YAMANAKA M K, SALIKI J T, et al. Mebus C and Yilma T. Cloning and expression of the nucleoprotein of peste des petits ruminants virus in baculovirus for use in serological diagnosis[J]. *Virology*, 1995, 208(2): 776-778.
- [19] LORFORDR E, NOTYAU L. Expression of core and precore antigens in insect cells and characterization of a core-associated kinase activity[J]. *Virology*, 1990, 176: 222-233.
- [20] MATSUURA Y, POSSEE RD, OVERTON HA, et al. Baculovirus expression vectors; the requirement for high level, expression of proteins including glycoprotein[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68(5): 1233.
- [21] 高 超,高云航,么乃全,等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因原核表达蛋白间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报,2008,(8):888-891.

(编辑 白永平)