

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.10

猪巨细胞病毒 gB 基因的原核表达与 间接 ELISA 检测方法的建立

朱月华, 刘 捷, 白 娟, 宋艳华, 王先炜, 姜 平 *

(南京农业大学 动物医学院 农业部动物细菌学重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:猪巨细胞病毒(PCMV)是引起新生仔猪死亡、鼻炎、肺炎和生长速度减缓的重要病原之一,我国尚无有效的诊断方法。为建立检测 PCMV 的 ELISA 方法,本研究以重组 PCMV 囊膜糖蛋白 B (gB 蛋白)为包被抗原,优化反应条件:抗原包被量 0.4 $\mu\text{g/mL}$,待检血清稀释度 1:100, 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,5%脱脂乳 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,二抗 1:10 000 稀释,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h,抗体临界值为 $S/P \geq 0.354$ 判为阳性, $S/P \leq 0.295$ 判为阴性,介于二者之间为可疑,建立了 PCMV 抗体间接 ELISA 检测方法。与猪瘟、猪伪狂犬病、猪附红细胞体病、副猪嗜血杆菌及猪圆环病毒 2 型等血清抗体无交叉反应,批间和批内重复性较好,对江苏省 259 份仔猪血清样品进行检测,抗体阳性率达 56.76%,从而为 PCMV 检测和流行病学调查提供了有效方法。

关键词:猪巨细胞病毒;重组囊膜糖蛋白 B;原核表达;间接 ELISA

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1008-0589(2013)01-0040-04

Development of an indirect ELISA for detecting antibodies to porcine cytomegalovirus with gB as coating antigen

ZHU Yue-hua, LIU Jie, BAI Juan, SONG Yan-hua, WANG Xian-wei, JIANG Ping*

(Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agricultural, College of Veterinary Medicine,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Porcine cytomegalovirus (PCMV) was one of the agents causing fetal and piglet deaths, runting, rhinitis, and pneumonia, as well as poor live weight gain. To establish the diagnostic method, an indirect ELISA was established for detection of the antibody against this virus by using recombinant gB protein as coating antigen expressed in *E. coli*. The optimized reaction conditions were including: coating with 0.4 $\mu\text{g/mL}$ antigen of PCMV gB at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hour and then overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$, blocking with 5% skim milk at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hours, incubating with the secondary antibody diluted in 1:10,000 at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 0.5 hour and judging with the cutoff value of $S/P \geq 0.354$. The assay was reproducibility and specific to PCMV antibody, but no reactions with the positive serum to swine fever, pseudorabies, porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine circovirus type 2 and *Haemophilus parasuis*. Furthermore, a total 259 clinical serum samples collected from pig farms in Jiangsu province were detected and the positive rate was 56.76%. These results indicated that this method could be used for PCMV epidemiological surveys and diagnosis of PCMV infections in pigs.

Key words: porcine cytomegalovirus; glycoprotein B; prokaryotic expression; indirect ELISA

*Corresponding author

收稿日期:2012-04-22

基金项目:农业部公益性行业专项(201003030-4、201203039);国家生猪产业体系专项(CARS-36)

作者简介:朱月华(1986-),女,河北衡水人,硕士研究生,主要从事畜禽传染病防治研究。

* 通信作者: E-mail: jiangp@njau.edu.cn

猪巨细胞病毒(Porcine cytomegalovirus, PCMV)属于疱疹病毒科 β 病毒亚科,可以引起新生仔猪死亡、鼻炎、肺炎和生长速度减缓。该病毒在世界范围内分布广泛,血清抗体阳性率很高。PCMV抑制宿主的免疫功能和防御机制,尤其是抑制T细胞功能,继发其他病菌感染。此外,猪被认为是异种器官移植的良好供体,PCMV在器官移植中备受关注^[1-3],非人类的灵长类动物受体器官中曾检测到PCMV^[4]。因此,建立一种灵敏、快速的PCMV检测方法十分必要。本研究对PCM的糖蛋白B(gB)进行原核表达作为包被抗原,建立了检测PCMV血清抗体的间接ELISA方法,为血清抗体的流行病学检测奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试验材料 重组质粒 pET32a-gB、鼠抗PCMV gB血清、30份PCMV标准阴性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、猪附红细胞体病(*M.suis*)、副猪嗜血杆菌病(HPs)血清抗体由本实验室制备保存;PCMV阳性血清由本实验室采用PCMV接种仔猪制备;猪瘟病毒(CSFV)和猪伪狂犬病病毒(PRV)抗血清来源于IDEXX ELISA试剂盒;蛋白Marker购自Invitrogen公司;ELISA板购自JetBiofil公司;酶标记葡萄球菌A蛋白(HRP-SPA)购自博士德生物工程有限公司;TMB购自南京博全生物工程有限公司。

1.2 重组蛋白的诱导表达与纯化 将已构建的重组质粒 pET32a-gB 和空质粒分别转化受体菌 BL21 内诱导表达,表达产物按说明书采用 His Bind Kit 过柱法纯化,通过 western blot 对重组蛋白进行鉴定。

1.3 ELISA 反应条件的优化

1.3.1 抗原包被浓度和待检血清最佳稀释倍数的确定 将纯化的PCMV gB蛋白稀释至终浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /孔进行包被。一抗设 1:50、1:100、1:200 和 1:400 4 个稀释度做方阵试验确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

1.3.2 包被时间的优化 根据确定的包被浓度,分别采用 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 进行包被,阴、阳性血清按照确定的稀释倍数进行 ELISA 测定,比较各组阴、阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值和 P/N 值,选择适合的包被时间。

1.3.3 封闭条件的优化 根据确定的包被浓度和时间,分别以含 5% 脱脂乳和含 1% BSA 的 PBST, 200 μL /孔进行封闭,封闭时间分别为:37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h,选择适合的封闭条件。

1.3.4 待检血清作用时间的优化 酶标板按照选择的条件包被、封闭后,加入阴、阳性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别作用 0.5 h、1 h、1.5 h,常规方法检测,选择适合的血清作用时间。

1.3.5 酶标抗体工作浓度的优化 待检血清按照确定的时间作用后,将酶标抗体分别进行 1:10 000、1:15 000、1:20 000 稀释,100 μL /孔,常规方法检测,选择适合的酶标抗体工作浓度。

1.3.6 酶标抗体作用时间的优化 将酶标抗体按照确定的稀释倍数加入酶标板后,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别作用 0.5 h、1 h、1.5 h,常规方法进行 ELISA 测定,选择适合的酶标抗体工作浓度。

1.4 临界值的确定 取 30 份 PCMV 阴性猪血清,按照已建立的检测方法进行 ELISA 测定,将得到的数据进行统计学分析,得到 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 平均值 $\bar{X}$ 和标准差 SD。根据统计学原理, $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq \bar{X} + 3\text{SD}$ 时,判为阳性。 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq \bar{X} + 2\text{SD}$ 时,判为阴性,介于二者之间者判为可疑。

1.5 特异性试验 按照建立的检测方法,分别对 CSFV、PRRSV、PRV、HPs、PCV2 和 *M.suis* 阳性血清进行检测,每份血清重复检测两个孔,根据 S/P 值判定其特异性。

1.6 敏感性试验 选取 8 份不同的 PCMV gB 阳性血清和一份阴性血清,在稀释 100 倍的基础上分别进行倍比稀释,检测所建立方法的敏感性。

1.7 重复性试验

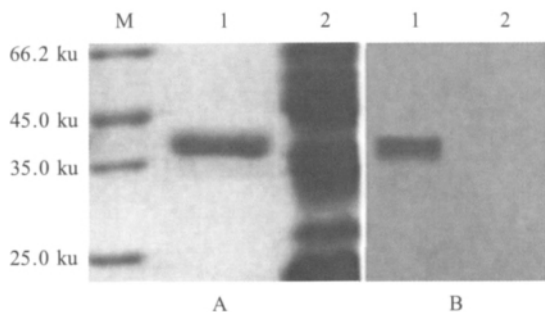
1.7.1 批内重复试验 采用同一批次制备的抗原包被 ELISA 板,取 5 份不同抗体水平的阳性血清和一份标准阴性血清,在同一批试验中进行 ELISA 测定,每份血清平行做 5 孔,结果进行统计学分析。

1.7.2 批间重复试验 采用不同时间制备的 3 批蛋白包被 ELISA 板,取 5 份不同抗体水平的阳性血清和 1 份阴性血清进行 ELISA 测定,每份血清平行做 2 孔,结果进行统计学分析。

1.8 临床血清样品检测 采用本实验建立的间接 ELISA 方法对 2011 年~2012 年江苏省 259 份仔猪血清进行检测。

2 结果

2.1 重组蛋白的原核表达、纯化和鉴定 重组菌经 IPTG 诱导表达重组蛋白 gB, 纯化后可见一条 39 ku 的目的蛋白条带(图 1A)。Western blot 鉴定结果显示, 该蛋白具有 PCMV 抗原特性(图 1B)。



M: Low molecular weight protein Marker; 1: Purified protein by His Bind Kit; 2: Cytosis of pET-32a (+)/BL21 plasmid as negative control

图 1 目的蛋白 SDS-PAGE (A)与 western blot 鉴定(B)
Fig.1 Identification of purified gB protein by SDS-PAGE and western blot

2.2 间接 ELISA 工作条件的优化 经过优化确定的最佳抗原包被量为 $0.4 \mu\text{g/mL}$; 待检血清稀释度 1:100; 包被时间为 37°C 作用 2 h; 然后 4°C 过夜; 5%脱脂乳 37°C 封闭 2 h; 血清作用时间为 1 h; 二抗 1:10 000 稀释, 37°C 作用 2 h。

2.3 临界值的确定 取 30 份阴性血清进行检测, 结果显示: $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 最高值为 0.316、最低值为 0.073, 其平均值 $\bar{X}$ 为 0.177, 标准偏差 SD 为 0.0589, 因此阳性样品检测下限为 $\bar{X}+3\text{SD}=0.354$ 。为了减少假阳性和假阴性血清出现的概率, 将临界值加减一个标准差设为可疑区, 即当 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.354$ 时判为阳性; 当 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq \bar{X}+2\text{SD}$ 即 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.295$ 时判为阴性, 介于两者之间判为可疑。

2.4 特异性试验 检测结果显示除 PCMV 阳性血清检测为阳性外, 其他 6 种猪病毒阳性血清及 PCMV 阴性血清均为阴性反应, 表明该方法特异性较高。

2.5 敏感性试验 采用 6 份 PCMV 阳性血清做滴度稀释后进行检测, 结果显示, 当血清稀释度达到 1:3 200 时, 6 份阳性血清的 S/P 值仍大于 0.354, 表明该方法敏感性较好(表 1)。

2.6 重复性试验 间接 ELISA 重复性试验结果显示, 批内重复性试验的变异系数为 2.9%~9.2%, 批间重复性试验的变异系数为 2.9%~9.9%, 均小于 10% (表 2), 表明该 ELISA 方法重复性较好。

表 1 ELISA 方法敏感性试验结果
Table 1 The sensitivity test of the ELISA

Serum samples	OD _{450nm} value and S/P of the serum at different dilution					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200
1	2.259/1.66	1.644/1.66	0.918/1.25	0.507/1.071	0.293/1.51	0.146/0.84
2	3.431/2.62	3.011/3.22	2.686/4.04	1.941/4.7	1.233/7.74	0.776/6.84
3	1.832/1.32	1.018/0.95	0.638/0.81	0.369/7.22	0.212/0.97	0.118/0.57
4	2.131/1.56	1.321/1.30	0.856/1.15	0.457/0.94	0.307/1.6	0.186/1.22
5	1.835/1.32	1.371/1.35	0.896/1.22	0.564/1.22	0.348/1.87	0.221/1.54
6	2.807/2.1	1.976/2.0	1.493/2.11	0.971/2.24	0.685/4.11	0.355/2.83
Positive cont.	1.437	1.062	0.759	0.479	0.216	0.163
Negative cont.	0.205	0.183	0.124	0.083	0.065	0.058

表 2 间接 ELISA 批内重复试验和批间重复试验结果
Table 2 Intra-assay and inter-assay reproducibility test of the indirect ELISA

Sample No.	Intra-assay variability		Inter-assay variability	
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	CV (%)	$\bar{X} \pm \text{SD}$	CV (%)
1	2.640±0.077	0.029	1.980±0.058	0.029
2	3.077±0.265	0.086	1.532±0.481	0.076
3	2.552±0.236	0.092	0.816±0.079	0.097
4	2.807±0.143	0.051	0.567±0.029	0.052
5	1.785±0.122	0.068	1.346±0.050	0.037
6	0.083±0.033	0.032	0.106±0.011	0.099

2.7 临床血清样品的检测 采用建立的间接 ELISA 方法对来自江苏省 259 份送检血清样品进行检测, 结果显示这些地区送检血清的 PCMV 抗体阳性率为 21.27%~91.67%, 阳性率为 57.76%, 其中南京和南通地区猪血清抗体检出率为 27.27%~36.36%, 扬州和淮安市血清抗体阳性率较高, 达 70%以上(表 3), 表明江苏省猪场 PCMV 感染比较普遍。

表 3 江苏省不同地区仔猪血清样品间接 ELISA 检测结果
Table 3 Result of detecting serum samples of pigs from Jiangsu province by indirect ELISA

Regions	Detected numbers	Positive numbers	Positive rate (%)
扬州 Yangzhou	19	15	78.95
镇江 Zhenjiang	16	8	50.00
沭阳 Shuyang	98	70	71.43
淮安 Huai'an	60	32	53.3
南京 Nanjing	22	6	27.27
南通 Nantong	44	16	36.36
合计 Total	259	147	56.76

3 讨论

PCMV 实验室检测方法主要有 PCR^[5-6]、荧光定量 PCR 方法^[7]、免疫组织化学方法等^[8]和 ELISA 抗体检测方法^[3], 其中前 3 种方法用于检测病毒基因和发病猪组织中病毒抗原。Yoo 等报道采用 PCMV 全病毒为抗原, 建立了间接 ELISA 方法, 可以用于检测 PCMV 抗体^[3]。但目前, 我国尚无商品化

PCMV 抗体检测试剂盒可供临床使用。本研究采用重组 gB 蛋白, 经过反应条件的优化, 建立 PCMV 间接 ELISA 抗体检测方法, 具有简单、快速、敏感和特异等优点, 可以用于 PCMV 抗体检测和流行病学研究。

ELISA 抗原是建立该方法的关键试剂之一。PCMV 基因结构与功能比较复杂, 目前已经有报道的病毒基因主要包括 DNA 聚合酶、核衣壳蛋白和囊膜糖蛋白(gB)等^[8-10], 其中, gB 蛋白为该病毒复制的必需结构蛋白, 具有较好的免疫原性, 可以诱导猪体产生中和抗体, 具有免疫保护作用^[11-12]。因此, 本研究选择 gB 蛋白作为 ELISA 抗原。为了提高该方法的特异性和敏感性, 我们采用本实验室构建的大肠杆菌表达的 gB 蛋白, 经过亲和层析方法纯化获得纯度较高的重组蛋白, 包被浓度仅为 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 使用效果较好。

PCMV 标准阴、阳性血清是确定该方法判定标准的重要试剂, 但由于该标准血清购置存在困难, 本项目前期研究采用 PCMV 人工感染仔猪, 制备获得 PCMV 血清为阳性血清, 同时以健康清洁级仔猪制备获得血清作为 PCMV 阴性血清。在此基础上, 我们再采用优化的 ELISA 反应条件, 选择 30 份 PCMV 阴性血清, 测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 计算平均值 $\bar{X}$ 和 SD 值, $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq \bar{X} + 3\text{SD}$ 为阳性, $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq \bar{X} + 2\text{SD}$ 为阴性, 介于两者之间判为可疑, 从而确定了该方法 PCMV 阴阳性血清判定条件。

当然, 由于没有商品化试剂盒, 该方法与其它抗体检测方法符合率试验尚不能进行。此外, 259 份临床血清样品检测结果初步表明, 江苏省规模猪场 PCMV 平均抗体阳性率为 57.76 %, 应引起关注。

参考文献:

- [1] Millard A L, Mueller N J. Can human viruses infect porcine xenografts [J]. *Xenotransplantation*, 2010, 17: 6-10.
- [2] Mueller N J, Mohamed E, Leo B, et al. Monitoring of porcine and baboon cytomegalovirus infection in xenotransplantation [J]. *Xenotransplantation*, 2009, 16: 535-536.
- [3] Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses [J]. *Can J Veterinary Res*, 2000, 64, 193-203.
- [4] Maria Isabel M C, Guedes, Jack M, et al. Reactivation of porcine cytomegalovirus through allogeneic stimulation [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(4): 1756-1758.
- [5] Lee C S, Moon H J, Yang J S, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of pseudorabies virus, porcine cytomegalovirus, and porcine circovirus in pigs [J]. *J Virol Methods*, 2007, 139: 39-43.
- [6] 刘捷, 陆琪, 王先炜, 等. 猪圆环病毒 2 型、猪巨细胞病毒和 TTV-2 混合感染的流行病学调查 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(8): 1095-1098.
- [7] Jacqueline F L F, Paul D G, Jay A F, et al. Quantitation of porcine cytomegalovirus in pig tissues by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3): 1155-1156.
- [8] Goltz M, Widen F. Characterization of the DNA polymerase Loci of porcine cytomegaloviruses from diverse geographic origins [J]. *Virus Genes*, 2000, 21(3): 249-255.
- [9] Rupasinghe V, Iwatsuki-horimoto V, Shunji S, et al. Identification of the porcine cytomegalovirus major capsid protein gene [J]. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(6): 609-618.
- [10] 王燕群, 徐志文, 郭万柱, 等. 猪巨细胞病毒 SC 株 DNA 聚合酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(09): 886-891.
- [11] Frederik W, Michael G, Wittenbrink N, et al. Identification and sequence analysis of the glycoprotein B gene of porcine cytomegalovirus [J]. *Virus Gene*, 2011, 23(3): 339-346.
- [12] 李晶, 余兴龙, 李润成, 等. 猪巨细胞病毒 gB 蛋白抗原表位富集区的表达和抗原性的分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(2): 126-130.

(本文编辑: 张朝霞)