

毛立, 刘霞, 李文良, 等. 边界病病毒 E2 蛋白质的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 93-99.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.014

边界病病毒 E2 蛋白质的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

毛立¹, 刘霞^{1,2}, 李文良¹, 杨蕾蕾¹, 张纹纹¹, 魏建忠², 江杰元¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要: 边界病病毒(Border disease virus, BDV)是导致绵羊和山羊繁殖障碍的重要病原。为了建立检测 BDV 特异抗体的 ELISA 方法,本研究将 BDV 基因克隆入原核表达载体 pET-32a(+),并构建重组表达菌,经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定目的蛋白质。以纯化的重组表达蛋白质为抗原,建立间接 ELISA (rE2-ELISA)检测方法。通过反应条件优化,确定抗原包被浓度 4.0 μg/ml;封闭液为 20 g/L BSA;血清最佳稀释度为 1:50,孵育 1 h;二抗最佳稀释倍数为 1:30 000,作用 45 min;以 TMB 为底物显色 10 min。用该 ELISA 方法检测瘟病毒属的 CSFV、BVDV 阳性血清,结果均为阴性。对 187 份山羊血清样品进行临床检测,与 Svanova 试剂盒检测结果阳性符合率为 76.25%,总符合率为 74.87%;上述检测方法同时与 Western blot 鉴定结果进行比较,结果显示,Western blot 结果与 rE2-ELISA 检测结果的符合率为 79.55%,高于与 Svanova 试剂盒检测的符合率(72.73%)。表明建立的间接 ELISA 检测方法可适用于临床 BDV 血清样品的抗体检测。

关键词: 边界病病毒; E2 蛋白质; 间接 ELISA

中图分类号: Q939.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)01-0093-07

Prokaryotic expression of border disease virus E2 and establishment of an indirect ELISA for serum antibody detection

MAO Li¹, LIU Xia^{1,2}, LI Wen-liang¹, YANG Lei-lei¹, ZHANG Wen-wen¹, WEI Jian-zhong², JIANG Jie-yuan¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Border disease virus (BDV) is main pathogen causing reproductive manifestations of sheep and goat. To develop an ELISA for detection of the specific antibody of BDV, the antigenic region of BDV E2 protein was amplified by RT-PCR, and cloned into pET-32a(+). The positive plasmid was transformed to BL21 and the recombinant bacteria were

obtained. The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. The indirect ELISA was developed successfully through the optimization of reaction system which involved coated antigen of 4.0 μg/ml, sealing buffer of 20 g/L BSA, serum sample at 1:50 dilution

收稿日期: 2014-06-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(14)2090]

作者简介: 毛立 (1985-), 男, 湖北荆州人, 助理研究员, 主要从事动物

疫病学诊断技术研究。(E-mail) mao-li@live.cn

通讯作者: 江杰元, (E-mail) jieyuanj57@gmail.com

and incubation for 1 h at 37 °C, HRP conjugated rabbit anti-pig IgG at 1 : 30 000 dilution and the reaction time of 45 min at 37 °C, and colour development at room temperature for 10 min. Coating antigen had no cross reaction with the antibodies against BVDV and CSFV. The rE2-ELISA showed a BDV positive coincidence rate of 76.25% and a total coincidence rate of 74.87% with Svanova ELISA kit. Western blot identification revealed a coincident rate of 79.55% in 44 serum sample, higher than that identified by Svanova ELISA kit. It was indicated that the rE2-ELISA was suitable for large-scale epidemiological investigation for BDV infection.

Key words: border disease virus; E2 protein; indirect ELISA

瘟病毒属病毒在反刍兽和猪等家畜中能引起严重的经济损失,如今,黄病毒科瘟病毒属病毒包括4个种,其中感染反刍动物的3个,牛病毒性腹泻病毒1型(Bovine viral diarrhoea virus type 1, BVDV-1), BVDV-2和边界病病毒(Border disease virus, BDV)^[1]。而瘟病毒属为RNA病毒,其高突变率导致新的病毒种不断出现,除了现有的4种病毒外,还新发现了Giraffe病毒、Pronghorn病毒、Bungowannah病毒和HoBi样瘟病毒,但是这些新病毒种尚未被正式承认^[2-3]。

边界病是由BDV引起的绵羊和山羊的一种先天性病毒病,临床感染可表现出多种症状,如母羊不孕、流产、死胎和木乃伊胎等繁殖障碍疾病;羔羊畸形发育、全身骨骼肌震颤等神经系统疾病以及持续性感染(Persistently infected, PI)。PI动物常见于绵羊,少见于山羊,是羊群中BDV的主要传染源。自1959年首次发现该病以来,英格兰、苏格兰、瑞士、美国、日本、澳大利亚、加拿大等许多养羊业发达的国家均有关于本病的报道。近年来,意大利、土耳其、突尼斯等地相继报道了BDV感染野生小反刍动物的病例,并分离出相应病原^[4]。BDV可以跨越宿主屏障,感染家畜以及多种野生小反刍动物,给世界经济带来了十分重大的经济损失。而在中国,直到2013年才首次从华东地区的腹泻山羊中分离到BDV,证明了边界病在中国的存在^[5]。

BDV基因组为单股正链RNA,长约12 300 bp,含有一个大的开放阅读框(ORF),两端分别为5'端非编码区(5'-UTR)和3'端非编码区(3'-UTR)。ORF编码一段大小约为3 900 bp的多肽蛋白质,在宿主和病毒蛋白酶的作用下,水解为12个结构蛋白质和非结构蛋白质。其中囊膜糖蛋白质E2是BDV的免疫优势蛋白质,能够诱发免疫系统产生针对BDV的中和抗

体,继而抵抗病毒的感染。目前,国内针对BDV感染的发生,大多数是通过PCR检测方法进行病原鉴定,尚无简便快捷的诊断方法。因而,针对E2蛋白质作为建立血清学诊断方法和研制新型活载体疫苗亚单位疫苗的候选抗原,建立快速有效的检测方法对于BDV的快速诊断具有重要意义^[6]。

本研究通过扩增BDV JSLS12-01分离株的E2抗原区,克隆入pET32a(+),构建重组大肠埃希菌,将目的蛋白质纯化后建立了检测BDV IgG抗体的间接ELISA方法。该检测方法特异、敏感、重复性较好,临床样品检测证实该方法可初步用于流行病学调查和抗体监测。

1 材料与方法

1.1 材料

pET-32a(+)载体由江苏省农业科学院兽医研究所保存;Trizol试剂购自Invitrogen公司;反转录试剂盒、大肠杆菌DH5 α 、BL21感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶购自大连宝生物工程有限公司;质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自Axygen公司;HRP标记的兔抗鼠IgG、兔抗山羊IgG购自北京博奥森生物技术有限公司;DAB显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品;BDV抗体检测试剂盒购自瑞典Svanova公司;进口分析纯His标签单抗和其他常规试剂购自Abmart公司。待检血清采集自江苏、安徽等地羊场。

1.2 方法

1.2.1 基因的PCR扩增 根据BDV JSLS12-01株基因序列(KC963426),比较基因序列的抗原性、疏水性等特征,选择抗原性高的区域,设计引物。上、下游引物各引入BamH I和Xho I位点,扩增基因中的基因片段。引物序列如下,F:5'-CGGGATCCTGTC-

CTTGTGATTCCAAGCC-3'; R: 5'-CCCTCGAGCTAAGC-TATCTCTAGGTTTCATA-3';以上引物由南京思普金生物科技有限公司合成。

根据 Trizol 试剂说明书,提取 BDV JSLS12-01 细胞毒的 RNA,溶于无 RNase 水中。用反转录试剂盒 Easyscript one-step RT-PCR SuperMix 进行 RT-PCR 扩增。反应体系 50 μ l,反应程序:45 $^{\circ}$ C 50 min;94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,反应 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 根据凝胶回收试剂盒说明回收目的条带。用 BamH I 和 Xho I 对该目的基因进行双酶切,回收纯化之后克隆到同样酶切处理的 pET-32a(+) 中,连接反应在 16 $^{\circ}$ C 过夜进行。连接产物转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,涂布含氨苄青的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落,在含氨苄青的 LB 培养基中振荡培养,提取质粒,经 PCR 和 BamH I、Xho I 双酶切鉴定。阳性质粒送南京思普金生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 重组表达菌株 BL21-E2 的构建与蛋白质表达 经序列测定正确的重组质粒 pET32a-E2 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。取过夜培养的菌液接种于新的培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约 0.6~0.8,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h,离心后超声裂解细菌,沉淀与上清液分别进行 SDS-PAGE 鉴定。蛋白质纯化方法参照 GE 公司 HisTrap HP 亲和纯化柱操作说明进行。分光光度计测定蛋白质浓度,分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 重组蛋白质的 Western blot 鉴定 SDS-PAGE 结束后,采用半干转印法将重组蛋白质转印至 NC 膜(Pall)上,用含 50 g/L 脱脂乳的 PBST 封闭 2.0 h;分别加入 1:100 稀释的 BDV 阳性羊血清和 1:1000 稀释的 Anti-His 单克隆抗体,室温孵育 2.0 h;PBST 洗涤 3 次;分别加入 1:2000 稀释的兔抗山羊 IgG-HRP 和山羊抗鼠 IgG-HRP,室温轻摇 1.5 h;PBST 洗涤 3 次,DAB 显色试剂盒显色。

1.2.5 间接 ELISA 检测方法的建立

1.2.5.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度

的选择 按照方阵法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将原核表达的 E2 蛋白质分别稀释至终浓度为 4.0 μ g/ml、2.0 μ g/ml、1.0 μ g/ml、0.5 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C 过夜包被酶标板。PBST 洗涤 3 次后,加入以 1:25、1:50、1:100 倍稀释的 BDV 阳性血清和阴性血清,每个稀释度重复 1 次,取其平均值,计算每个条件下阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值比值(P/N)。选择阳性血清 OD 值接近 1.0,P/N 值最大的反应条件作为 ELISA 的最佳反应条件。

1.2.5.2 封闭液的选择 参照方法 1.2.5.1 中确定的最佳抗原浓度包被酶标板,分别用含 50 g/ml 的脱脂乳、10 g/ml 的明胶、20 g/ml 的 BSA、5% 的马血清的 PBST 1 孔 200 μ l 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。检测 7 份阳性血清和 1 份阴性血清,计算 P/N 值以筛选最佳封闭液。

1.2.5.3 待检血清作用时间 按上述筛选条件包被封闭酶标板后,加入阴性、阳性血清于 37 $^{\circ}$ C 分别作用 0.5 h、1.0 h、1.5 h,计算 P/N 值,筛选最佳作用时间。

1.2.5.4 二抗浓度优化 按上述条件进行包被封闭加样,洗涤后分别加入 1:20000、1:30000、1:40000、1:50000 倍稀释的兔抗山羊 IgG-HRP 100 μ l 进行 ELISA 检测并计算 P/N 值以筛选二抗浓度。

1.2.5.5 二抗作用时间优化 按上述条件进行包被封闭加样,加入二抗后 37 $^{\circ}$ C 分别孵育 30 min、45 min、60 min,通过测定 ELISA 检测结果的 OD 值,比较 P/N 值以选择最适二抗作用时间。

1.2.5.6 显色时间优化 按照前面筛选条件进行 ELISA 试验,加入 TMB 后分别显色 5 min、10 min、15 min。计算 P/N 值,筛选最佳显色时间。

1.2.6 ELISA 临界值确定 将经瑞典 Svanova 公司 BDV 抗体 ELISA 检测试剂盒和 Western blot 检测均为阴性的山羊血清样品 40 份,用建立的 ELISA 方法检测,计算平均值(X)和标准差(SD),以 $X+2SD$ 作为阴性判定标准, $X+3SD$ 作为阳性判定标准。

1.2.7 特异性试验 用建立的 ELISA 方法对 CSFV、BVDV 阳性血清进行检测,验证该检测方法的特异性。

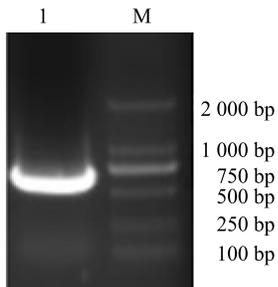
1.2.8 临床血清样品检测 用该 ELISA 方法对

187 份临床血清样品进行检测。以上述试验确定的判定标准为依据,对检测结果进行判定,并与 Svanova 公司 BDV 抗体检测试剂盒进行比较,计算二者符合率。部分血清样品同时进行 Western blot 鉴定,并分别计算与 Svanova 试剂盒和试验建立的 ELISA 方法的符合率。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

RT-PCR 扩增得到目的基因条带(图 1),与预期扩增大小一致。经测序鉴定基因大小为 630 bp,与目的基因一致。克隆到原核表达载体 pET32a(+),转化 DH5 α ,提取质粒,将 PCR 鉴定阳性的质粒进一步经酶切鉴定,如图 2 所示,可以得到相应的目的条带,证明克隆成功,该质粒经测序证明基因序列正确并符合载体阅读框。



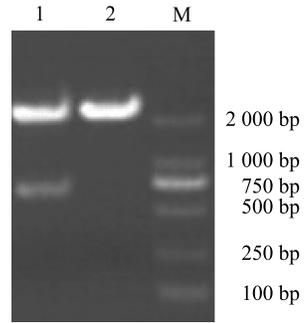
M:DL2000 marker;1:PCR 产物。

图 1 BDV E2 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of BDV E2 gene

2.2 重组蛋白质的表达与鉴定

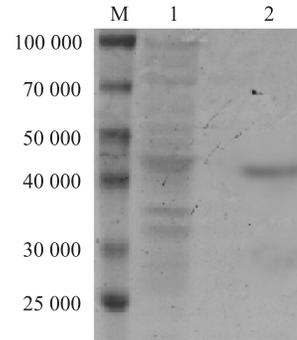
挑取阳性重组质粒转化 BL21 并进行诱导表达,收集菌体,超声裂解后分离包涵体和上清液,与空质粒转化的 BL21 诱导产物一起进行 SDS-PAGE 电泳。在 40 000 ~ 50 000 之间有明显的目的蛋白质表达条带(图 3),主要以包涵体形式存在,空质粒(对照)无相应条带。用 BDV 阳性羊病毒血清和 Anti-His 单抗对目的蛋白质进行 Western blot 鉴定,可检测到特异性条带,证明重组蛋白质具有良好的抗原性(图 4)。对目的蛋白质进行纯化,可以得到高纯度的重组 BDV-E2 蛋白质,经测定蛋白浓度为 1.81 mg/ml,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。



M:DL2000 marker;1:*Bam*H I/*Xho* I 双酶切重组质粒 pET32a-E2;2:空质粒(对照)。

图 2 pET32a-E2 重组质粒的双酶切鉴定

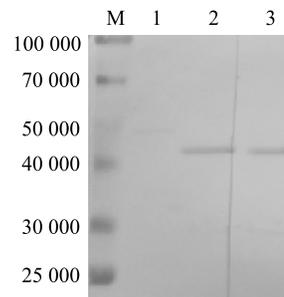
Fig. 2 Restrictive digestion of recombinant plasmid pET32a-E2



M:Marker;1:空载体诱导产物;2:纯化后包涵体。

图 3 重组蛋白质 BDV-E2 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant BDV-E2 protein



M:Marker;1:His 单抗鉴定空载体诱导产物;2:His 单抗鉴定重组 BDV-E2 蛋白质;3:BDV 阳性羊血清鉴定重组 BDV-E2 蛋白质。

图 4 重组 BDV-E2 蛋白质的 Western blot 鉴定

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant BDV-E2 protein

2.3 间接 ELISA 反应条件的优化及判定标准的确定

经方阵法测定筛选阳性血清 OD 值(P)接近 1 和 P/N 值最大的条件,最终确定最佳抗原包被浓度为 $4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ (1 孔 $0.4 \mu\text{g}$),血清最佳稀释度为 1 : 50(表 1)。通过设置不同反应条件检测 7 份阳性血清和 1 份阴性血清以阴性血清 OD 值(N)、阳性血清 OD 值(P)和 P/N 值为判定依据,最终确定 20 g/L BSA 为最佳封闭液,待检血清反应时间为 1 h,洗涤后加入 1 : 30 000 稀释的兔抗山羊 IgG-HRP 作用 45 min, TMB 显色 10 min(表 2 ~ 表 6)。

依据上述确定的反应条件检测 40 份阴性血清,计算平均值 X 为 0.263,标准差 SD 为 0.068。则血清 OD 值 $\leq X+2SD$,即小于等于 0.399,判为阴性;OD 值 $\geq X+3SD$,即大于等于 0.467 判为阳性;介于两者之间判为可疑,重复检测 1 次,若仍为可疑,即判为阳性。

表 2 封闭液的优化结果

Table 2 Optimization of blocking buffer

封闭液	P/N 值							
	血清样品 1	血清样品 2	血清样品 3	血清样品 4	血清样品 5	血清样品 6	血清样品 7	阴性血清
50 g/ml 脱脂乳	6.45	3.71	4.11	1.95	1.33	2.47	2.14	0.340
10 g/ml 明胶	6.71	1.92	4.69	2.72	2.72	2.99	2.70	0.274
5% 马血清	5.16	2.03	3.64	3.52	3.06	3.00	3.10	0.233
5 g/ml BSA	6.56	3.25	5.14	4.66	2.93	3.65	3.81	0.242
20 g/ml BSA	8.37	3.62	6.94	5.36	5.88	5.04	4.27	0.168

P/N : 阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值的比值。

表 3 血清最佳作用时间的优化结果

Table 3 Optimization of reaction time for serum samples

作用时间 (h)	P/N 值							
	血清样品 1	血清样品 2	血清样品 3	血清样品 4	血清样品 5	血清样品 6	血清样品 7	阴性血清
0.5	2.55	3.67	2.33	3.67	2.30	1.99	2.03	0.201
1.0	6.13	5.38	5.42	4.55	5.09	4.91	5.89	0.177
1.5	3.32	3.56	3.71	2.17	2.50	4.04	2.64	0.249

P/N : 阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值的比值。

表 4 二抗浓度的优化结果

Table 4 Optimization for dilution of anti-goat IgG-HRP

二抗稀释倍数	P/N 值							
	血清样品 1	血清样品 2	血清样品 3	血清样品 4	血清样品 5	血清样品 6	血清样品 7	阴性血清
1 : 20 000	4.83	4.47	3.66	4.68	3.95	2.98	3.68	0.357
1 : 30 000	5.33	4.98	4.75	5.09	3.79	5.17	4.82	0.210
1 : 40 000	4.78	5.56	5.09	4.86	4.18	5.37	4.63	0.124
1 : 50 000	3.64	4.51	4.70	3.84	3.69	4.39	4.97	0.093

P/N : 阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值的比值。

表 1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的优化

Table 1 Optimization of the optimum concentration of coated antigen and optimum dilution of serum

抗原包被浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	指标	血清稀释度	血清稀释度	血清稀释度
		1 : 25	1 : 50	1 : 100
4.0	P	1.426	1.089	0.847
	N	0.351	0.147	0.235
	P/N	4.060	7.410	3.600
2.0	P	0.936	0.824	0.614
	N	0.380	0.339	0.277
	P/N	2.460	2.430	2.220
1.0	P	1.249	1.173	0.932
	N	0.372	0.307	0.253
	P/N	3.360	3.820	3.680
0.5	P	1.507	1.367	1.087
	N	0.319	0.254	0.204
	P/N	4.720	5.380	5.330

N : 阴性血清 OD 值; P : 阳性血清 OD 值; P/N : 阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值的比值。

表 5 二抗作用时间的优化结果

Table 5 Optimization of reaction time of anti-goat IgG-HRP

反应时间 (min)	P/N 值							阴性
	血清样品 1	血清样品 2	血清样品 3	血清样品 4	血清样品 5	血清样品 6	血清样品 7	
30	5.62	5.36	4.97	5.79	4.28	4.65	5.44	0.142
45	5.73	5.90	6.18	5.97	6.22	5.41	5.63	0.185
60	4.09	3.68	3.87	4.40	3.95	4.35	4.13	0.243

表 6 底物显色时间的优化结果

Table 6 Optimization of reaction time of substrate

指标	显色 5 min	显色 10 min	显色 15 min
P	0.646	1.057	1.429
N	0.126	0.193	0.387
P/N	5.130	5.480	3.690

N: 阴性血清 OD 值; P: 阳性血清 OD 值; P/N: 阳性血清 OD 值与阴性血清 OD 值的比值。

2.4 特异性

用建立的 ELISA 方法检测 CSFV、BVDV 阳性血清, 结果 OD 值均小于 0.2, 低于阴性判定标准 0.399, 所以检测与 BDV 同为瘟病毒属的 CSFV、BVDV 阳性血清为阴性, 表明本方法具有很高的特异性, 不与同属其他病毒抗体发生交叉反应。

2.5 临床样品检测

利用 BDV rE2-ELISA 检测方法和 Svanova 公司 BDV 抗体检测试剂盒同时检测 187 份来自不同地区羊场的血清样品。间接 ELISA 方法检测阳性率为 47.59%, 阴性率为 52.41%; Svanova 试剂盒检测阳性率为 42.78%, 阴性率为 57.22%; 二者阳性符合率为 76.25%, 阴性符合率为 73.83%, 总符合率为 74.87%。随机挑选 44 份血清进行 Western blot 鉴定, 与 rE2-ELISA 检测符合率为 79.55%, 与 Svanova 试剂盒检测结果符合率为 72.73%。

3 讨论

羊边界病病毒 (BDV) 所致疾病大多为不明显的先天性疾病, 少见大流行或者暴发流行, 以母羊生殖障碍和羔羊多种畸形发育为主要特征^[7-9]。因 1959 年首次发现于英国的英格兰和威尔士边界地区的羊群中而得名, 是一种呈世界性分布的病毒性疾病。该病毒主要感染动物为绵羊和山羊, 偶有牛、猪和其他野生反刍动物的感染^[10]。目前, 检测 BDV

的方法较少, 大多检测 BDV 病原的方法都是依靠检测病原基因组, 包括 RT-PCR 方法和荧光定量方法^[11]。检测 BDV 抗体的试剂盒罕见, 通用的试剂盒为瑞典 Svanova 公司生产的 BDV 抗体检测试剂盒。由于 BDV 为国内新发现的病毒, 在该病毒的毒力、检测方法等方面均没有系统研究。本研究首次通过原核表达系统表达了重组 BDV-E2 蛋白质, 并用 Anti-His 单抗进行检测, 结果显示, 该蛋白质能与 Anti-His 单抗发生反应, 证实该蛋白质成功表达。同时, 用 Svanova BDV 抗体试剂盒检测为阳性的山羊血清鉴定表达的重组 BDV-E2 蛋白质, 在目的蛋白质处也出现明显条带, 证明该蛋白质能与 BDV 阳性血清发生反应, 可以用作建立间接 ELISA 方法时的抗原, 为成功建立 BDV 检测方法打下基础。

E2 基因是瘟病毒的主要保护性抗原编码基因, ELISA 检测方法则以其快捷、特异、敏感以及操作简便等特点成为目前动物疫病研究常用的诊断技术, 尤其是针对大批量的样品检测时, 其优势更为突出。研究利用原核表达的 BDV-E2 蛋白质作为包被抗原, 建立的间接 ELISA 方法对与 BDV 同属的 CSFV、BVDV 阳性血清进行检测, 结果均为阴性, 表明建立的 ELISA 方法具有良好的特异性, 排除了属间的交叉反应。

进行临床血清样品检测时, 研究建立的 rE2-ELISA 方法与 Svanova 试剂盒检测结果阳性符合率为 76.25%, 阴性符合率为 73.83%, 总符合率为 74.87%。由于试验建立的 ELISA 检测方法采用的抗原为原核表达的 E2 蛋白质, 检测的是针对该蛋白质上抗原表位的抗体; 而 Svanova 试剂盒包被的抗原则为全病毒, 检测的抗体可能针对 E2 表位, 也可能包含其他表位; 同时由于 BDV 不同地区分离毒株之间蛋白质差异较大, 均可能导致二者检测结果的差异。在用 Western blot 进行鉴定的结果比较中, 发现试验建立的 ELISA 检测方法与其符合率为

79.55%, Svanova 试剂盒检测结果与其符合率为 72.73%, 分析导致这种差异的可能原因为蛋白质变性前后, E2 蛋白质表位的结构发生了变化以及不同毒株间 E2 蛋白质的差异性, 导致了 3 种检测方法之间各有所不同。临床样品检测结果表明本研究建立的间接 ELISA 方法检测结果较为理想, 特异性较高, 为羊群边界病的监测以及临床血清样品的快速有效检测、开发 BDV 抗体检测试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] THIEL H J, COLLETT M S, GOMLD E A, et al. Family flaviviridae virus taxonomy. classification and nomenclature of viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] DUBOIS E, RUSSO P, PRIGENT M, et al. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006[J]. Vet Microbiol, 2008, 130 (1-2): 69-79.
- [3] HIRTADP A, ADURIZ G, GOMEZ N, et al. Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) in Spain [J]. J Wildl Dis, 2004, 40(4): 796-800.
- [4] PATON D J, CARLSSON U, LOWINGS J P, et al. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep[J]. Vet Microbiol, 1995, 43(4): 283-294.
- [5] LI W, MAO L, ZHAO Y, et al. Detection of border disease virus (BDV) in goat herds suffering diarrhea in eastern China[J]. Virol J, 2013, 10:80.
- [6] NETTLETON P F, GILMOUR J S, HERRING J A, et al. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1992, 15 (3): 179-188.
- [7] OGUZOGLU T C, TAN M T, TOPLU N, et al. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? [J]. Vet Microbiol, 2009, 135 (3-4): 374-379.
- [8] STRONG S A, L A ROCCA, G IBATA, et al. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle[J]. Vet Microbiol, 2010, 141 (3-4): 208-215.
- [9] VILCEK S, BELAK S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs[J]. J Virol Methods, 1996, 60 (1): 103-108.
- [10] VILCEK S, NETTLETON P F, PATON D J, et al. Molecular characterization of ovine pestiviruses[J]. J Gen Virol, 1997, 78 (4): 725-735.
- [11] SCHIRRMEIER H, STREBELOW G, TAVELLA A, et al. Border disease virus infection in cattle: epidemiological and diagnostic impact[M]. Sweden: The 7th ESVV Pestivirus Symposium, 2008.

(责任编辑:袁伟)