

伪狂犬病病毒 gE 基因主要抗原表位区的原核表达及其在疫苗接种和自然感染鉴别诊断中的应用

倪健强 张春玲** 童光志* 仇华吉 王云峰 田志军

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

摘 要 根据伪狂犬病病毒(PRV)Min-A 株 gE 基因序列 ,利用 PCR 方法扩增了 PRV gE 基因不含信号肽、胞内区和跨膜区的主要抗原表位区 ,并克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 中 ,获得的重组质粒命名为 pGEX-tgE。经 SDS-PAGE 电泳分析证实克隆的部分 gE 基因获得了表达 ,融合表达产物大小约为 63kD ,并在终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG 诱导下 3.5h 其表达量达到高峰。通过改变诱导条件 ,有效抑制了包涵体形成 ,提高了重组蛋白的溶解性。Western blot 分析证实表达的重组 gE 蛋白具有抗原反应活性。将表达产物利用亲和层析法纯化后作为 ELISA 抗原 ,通过对其特异性、敏感性 & 工作条件的优化试验 ,和对 48 份 PRV 阴性血清样品的检测结果的统计学分析 ,建立了猪伪狂犬病 tgE-ELISA 鉴别诊断方法。通过对 400 份送检血清样品的检测结果分析 ,表明其与 PRV 全病毒 ELISA 试验的符合率高达 95% 以上 ,与基于抗 gE 蛋白单抗竞争性 ELISA 的符合率达 94%。此方法可用于 gE 基因缺失 PRV 疫苗免疫动物和 PRV 自然感染动物的鉴别诊断。

关键词 PRV , gE , 鉴别诊断

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0526-06

伪狂犬病(pseudorabies ,PR)是由伪狂犬病病毒(PRV)引起的家畜和多种野生动物共患的一种急性传染病。伪狂犬病病毒属疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科成员 ,主要贮主为猪和鼠。除猪外 ,其他易感动物感染本病为高度致死性感染 ,但呈散发形式。该病对猪危害严重 ,主要引起种猪不育、妊娠母猪流产、死产和产木乃伊胎 ,新生仔猪和断奶仔猪大量死亡 ;育肥猪增重减慢等症状。伪狂犬病呈全球性分布流行 ,在我国伪狂犬病已蔓延至许多省市 ,给畜牧业造成巨大的经济损失^[1]。长期以来 ,对伪狂犬病防治的主要措施是接种疫苗。上世纪 80 年代末 ,基因缺失标记疫苗及相应的弱毒疫苗免疫和野毒感染鉴别诊断技术相继问世并得到应用 ,使猪伪狂犬病的根除成为可能^[2-3]。90 年代初期 ,部分伪狂犬病流行国家正式启动本病的根除计划。即在使用疫苗防制本病的同时 ,配合以适当的鉴别诊断方法诊断出野毒感染猪 ,对已感染野毒的猪进行扑杀淘汰 ,从地区性净化猪场直至全国性根除本病。目前 ,荷兰、美

国、欧盟等许多国家或地区先后宣布了根除计划的成功^[4-5]。

目前 ,伪狂犬病在我国猪群中广泛流行 ,gE 基因缺失的弱毒疫苗也已广泛使用 ,但单纯使用疫苗并没有从根本上解决问题。因此 ,能有效区分野毒感染猪和疫苗免疫猪的鉴别诊断技术是最终根除伪狂犬病的关键。据对上百株 PRV 的分析证明 PRV 野外分离毒株均含有 gE 基因且较为保守^[6] ,表明 gE 蛋白是建立鉴别诊断的理想标志蛋白。目前 ,在一些发达国家使用的是基于抗 gE 蛋白单克隆抗体的竞争性 ELISA 鉴别诊断试剂盒 ,价格昂贵 ,在我国很难推行。我国冉智光等^[7]曾经建立 PCR 鉴别诊断技术 ,但在实际应用时很难掌握。因此 ,本实验利用克隆表达的 PRV 主要抗原活性区作为抗原建立了 PRV 鉴别诊断技术 ,不仅拥有自主知识产权 ,而且对我国根除伪狂犬病具有实际意义。

收稿日期 2003-11-20 ,修回日期 2004-02-23。

基金项目 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助(No.2001AA213051)。

* 通讯作者。 Tel 86-451-82734181 ; Fax 86-451-82734181 ; Email :gzong@public.hr.hl.cn

** 现在上海市农业科学院畜牧兽医研究所。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料与方法

1.1 病毒和血清

PRV 闽 A 毒株,由中国兽药监察所提供;伪狂犬病阳性血清和阴性血清由本室保存;抗流感病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪轮状病毒、传染性胃肠炎病毒、细小病毒、流行性腹泻病毒、大肠杆菌、猪丹毒和猪瘟病毒阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所疫病防治研究室提供;现地送检血清来自山东、黑龙江、辽宁、吉林和哈尔滨等地。

1.2 载体、受体菌和试剂

表达载体 pGEX-6P-1、受体菌 BL21 由本实验室保存。pMD18-T 载体、各种限制酶及修饰酶购于大连宝生物公司;GST 标签纯化试剂盒购自 Mersham Biosciences 公司;IPTG、卡那霉素购自上海生工;辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 抗体购自 Invitrogen 公司。

1.3 PRV 的培养及病毒 DNA 的提取

取冻干的 PRV Min-A 株种毒以细胞维持液稀释后,接种单层 PK-15 细胞,当 CPE 达 75% 时,收获细胞。加入预冷的 PBS 轻轻洗涤细胞 3 次后,加入蛋白酶 K 细胞消化裂解液(10mmol/L Tris·HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA, 0.2mol/L NaCl, 0.125% Triton X-100, 0.25% Sodium Dodecyl Sarcosinate, 100 μ g/mL 蛋白酶 K)作用 10min,之后分别以酚(1次)、酚/氯仿(2次)和氯仿(1次)抽提,乙醇沉淀,洗涤,干燥后加适量 TE(10mmol/L Tris·HCl, 1.0mmol/L EDTA, pH8.0)溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

经过对 PRV gE 基因亲水功能区的分析结合相关的研究报告^[8-11],用 PCR 扩增了截短的 gE 基因(tgE),此部分包含有 gE 蛋白的抗原反应区(64~1008nt),同时去除了蛋白胞内区、跨膜区和信号肽的部分(图 1)。根据 GenBank 中 Min-A 株 PRV gE 基因核苷酸序列设计一对特异性引物,用于 gE 基因的 PCR 扩增。上游引物序列,5'-CGGATCCCCGAGC-CTCTCCGCCGAGAC-3',含有 BamH I 位点;下游引物序列,5'-GAAGCCGTCGACGGGTCAGGCGGTCAG-3',含有 Sal I 位点,扩增片段大小约为 1.0kb。

1.5 表达载体的构建

取上述提取的病毒 DNA,利用所设计的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物胶回收后,与 pMD-18 T 载体连接,转化后通过酶切筛选到阳性重组质粒,命名为 pMD-tgE。利用限制酶 BamH I 和 Sal I 双酶切

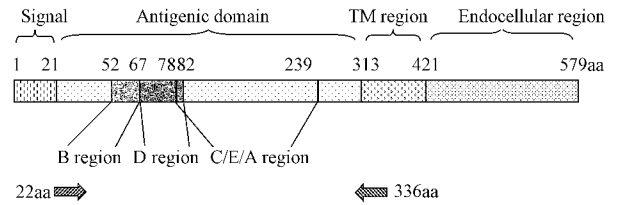


图 1 gE 蛋白结构示意图(箭头所指为引物扩增区域)

Fig.1 The illustration of gE protein

(the area between two arrows was cloned)

pMD-tgE,回收 gE 基因和同样处理的原核表达载体 pGEX-6P-1 连接,转化 BL21 菌。碱裂解法小量提取质粒, BamH I / Xho I 双酶切筛选阳性重组质粒,并命名为 pGEX-tgE,将 pGEX-tgE 送上海博亚生物公司测序。

1.6 tgE 基因的诱导表达

将含有重组质粒 pGEX-tgE 的 BL21 菌种在含氨苄青霉素的 LB 平板上划线,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取单个菌落,于含 Amp 的 LB 中 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.7 时加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.2~1 mmol/L,继续于 25~37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3~6 h,收获细菌。离心后将菌体用 0.5mol/L NaCl、20mmol/L Tris·HCl(pH=7.6)洗 2 次,然后用 PBS 悬浮细胞,加入新鲜配制的溶菌酶至终浓度 1mg/mL 于 4 $^{\circ}$ C 作用过夜后,在高强度超声波的作用下裂解 6 次,每次 10s,间隔 10s,然后,离心取上清和沉淀分别加入等体积的 2 \times SDS 电泳上样缓冲液裂解细胞,置于沸水中煮沸 10min,使蛋白质充分变性后用 10% 凝胶进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。

1.7 重组蛋白的纯化及免疫反应活性分析

将已经与亲和树脂结合的重组蛋白利用 Pre-Scission Protease 酶消化其 GST 标签,操作过程参照 PreScission Protease 酶说明书进行。之后加入适量的酶切缓冲液洗脱目的蛋白。

纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,用猪伪狂犬病标准阳性血清进行 Western blot 分析。

1.8 间接 ELISA 诊断方法的建立

1.8.1 间接 ELISA 程序 (1) 将重组 tgE 用碳酸盐包被缓冲液(0.05mol/L CBS, pH9.6)作适当稀释后被聚苯乙烯微量反应板,4 $^{\circ}$ C 过夜,经洗涤、封闭后用于检测或 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用 (2) 将待检血清适当稀释后,与上述包被后的微量反应板 37 $^{\circ}$ C 作用一定时间,洗涤 (3) 将酶标兔抗猪抗体做适当稀释后,与上一步的微量反应板作用一定时间,洗涤 (4) 加入

底物显色缓冲液,避光显色一定时间以后终止反应并测定每孔的光密度吸收值(OD值),对结果进行分析判定。

1.8.2 间接 ELISA 试验条件的优化 :利用方阵滴定法分别对 20 ~ 0.2 μ g/孔的抗原包被量、1:5 ~ 1:200 的血清稀释度、0.5 ~ 2h 的血清作用时间、5 ~ 20min 的底物显色时间进行标化。

1.8.3 间接 ELISA 判定标准的获得 :对 47 份背景明确的阴性血清按最适条件进行 ELISA 反应,结果进行统计学分析。

1.8.4 特异性试验 :在同一条件下对猪流感病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪轮状病毒、传染性胃肠炎病毒、细小病毒、流行性腹泻病毒、大肠杆菌、猪丹毒和猪瘟病毒特异性阳性血清及 SPF 猪血清按间接 ELISA 程序测定。

1.8.5 重复性试验 :4 份血清样品在同一批次试验中每份样品平行设 6 个重复(批内重复);另外在 6 个不同试验日重复测定 4 份样品(批间重复)。分析试验结果。

1.8.6 对现地送检血清样品的检测及与中和试验、单抗竞争 ELISA 试验的对比 :随机从山东、黑龙江、辽宁、吉林等地的送检血清中选择了 400 余份血清,利用病毒中和试验、全病毒 ELISA 和本实验建立的 tgE-ELISA 同时进行检测,对比检测结果。此外,对已用国外单抗竞争性 ELISA 试剂盒检测的 85 份血清用 tgE-ELISA 检测,对比结果。

2 结果

2.1 截短的 PRV gE 基因的克隆

提取 PRV DNA,用设计合成的特异性引物经 PCR 扩增后,得到了约 1.0kb 的片段,这与预期的 tgE 基因片段的大小一致(图 2)。将扩增所得产物与 pMD-18 T 载体连接,通过酶切筛选到阳性质粒 pMD-tgE(图 3)。用限制酶 *Kpn* I / *Sal* I 对 pMD-tgE 和 pGEX-6P-1 进行消化处理,T4 DNA 连接酶连接,筛选出的阳性质粒命名为 pGEX-tgE(图 4)。测序结果显示 tgE 编码框全长 945bp,编码 315 个氨基酸残基。

2.2 PRV tgE 基因的表达及产物活性检测

收获的细菌裂解后经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后可见 63kD 的融合蛋白条带,在终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG 诱导下,3.5 h 其表达量达到高峰(图 5)。薄层扫描分析,该蛋白占菌体蛋白总量的 30%。此外,对表达条件进行改变,发现降低

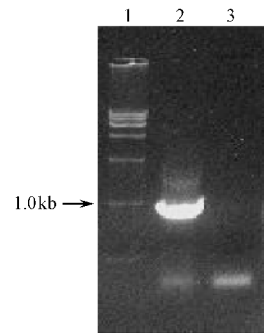


图 2 tgE 基因 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR products of tgE gene

1 :Marker DL15000 2 :PCR product of PRV tgE 3 :Negative control

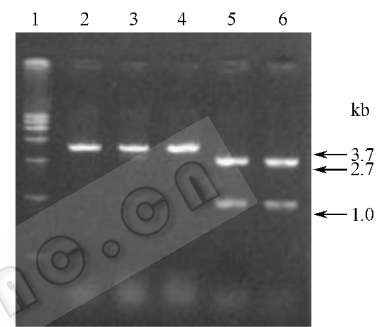


图 3 重组质粒 pMD-tgE 酶切鉴定结果

Fig.3 Identification of the recombinant pMD-tgE with restriction enzyme digestion

1 :Marker DL15000 2 ~ 4. pMD18-tgE(insert into plasmid clockwise) digested with *Sal* I ; 5 ~ 6 :pMD18-tgE(insert into plasmid anticlockwise) digested with *Sal* I

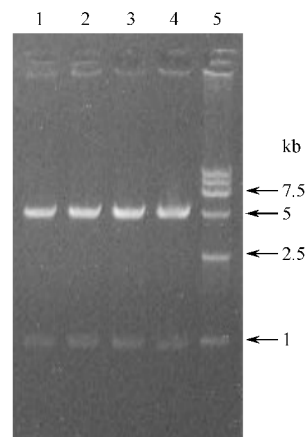


图 4 表达载体 pGEX-tgE 酶切鉴定结果

Fig.4 Identification of the recombinant plasmid pGEX-tgE with restriction enzyme digestion

1 ~ 4 : pGEX-tgE Digested with *Bam*H I / *Xho* I 5 : DL-15000 Marker

诱导剂 IPTG 的诱导浓度至 0.1mmol/L、降低诱导温度至 25 $^{\circ}$ C 的条件下,可以有效的抑制蛋白包涵体的形成,促进蛋白的可溶性(图 6)。利用亲和层析法

纯化重组蛋白, 结果蛋白的纯度可以达到 90% 以上。将经纯化、蛋白酶酶切后的重组 tgE 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用 PRV 多克隆阳性血清作适当稀释后进行 Western blot 分析, 结果在约 34kD 处观察到了特异性的反应条带(图 7)。

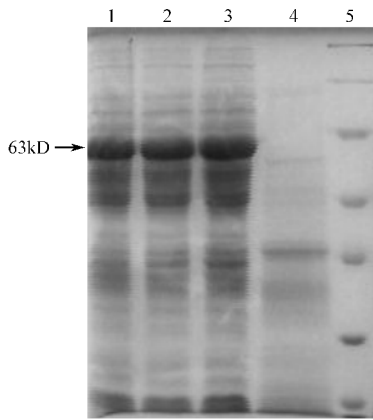


图 5 表达质粒 pGEX-tgE 在受体菌 BL21 中诱导表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE of recombinant gE expressed in *E. coli* BL21
1~3: expressed products of *E. coli* containing pGEX-tgE at 4.5, 4 and 3.5 hours after induction; 4: expressed products of *E. coli* containing pGEX-6p-1; 5: protein marker

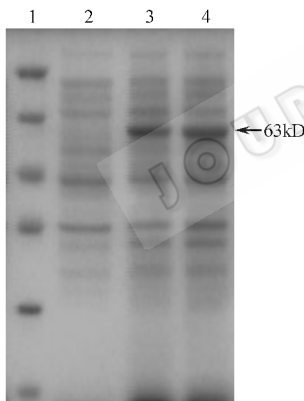


图 6 改变表达质粒 pGEX-tgE 在受体菌中诱导的条件后 可溶性表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.6 SDS-PAGE of recombinant gE expressing in *E. coli* BL21 in various induction conditions

1: protein marker; 2: the soluble fraction of expression product in *E. coli* containing pGEX-tgE in 37°C; 3, 4: the soluble fraction of expression product in *E. coli* containing pGEX-tgE in 25°C with IPTG concentration of 0.2mmol/l(3) and 0.1 mmol/l(4)

2.3 tgE-ELISA 工作条件的确定

2.3.1 抗原包被量的确定: 将重组蛋白经亲和层析法纯化后按 20 ~ 0.2μg/孔 包被聚苯乙烯微量反应板, 选取试验用阳性血清和阴性血清 OD 值比值(P/N)最为明显的 2μg/孔 作为抗原的最佳工作量。

2.3.2 血清作用稀释度及工作时间的确定: 抗原

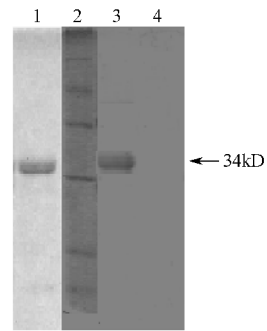


图 7 表达 tgE 蛋白 Western blot 分析结果

Fig.7 Western blot analysis of recombinant tgE protein

1 SDS-PAGE of purified recombinant gE; 2 Protein marker; 3 Western blotting result with expression products of *E. coli* containing pGEX-tgE; 4 Western blotting result with expression products of *E. coli* containing pGEX-6p-1

按最佳工作量包被反应板后, 血清作 1:5 ~ 1:200 的倍比稀释, 分 30、60、90、120min 不同作用时间进行 ELISA 方阵反应, 选取标准阳性血清和阴性血清比值最为明显的一组, 即 1:30 稀释倍数、60min 作用时间作为血清最适作用稀释度和最适作用时间。

2.3.3 显色时间的确定: 抗原和血清均按最佳工作条件, 显色时间为 5、10、15min 对阳性、阴性血清进行 ELISA 测定。结果显色时间为 10min 时, P/N 值最为明显, 选作最佳显色时间。

2.3.4 tgE-ELISA 判定标准: 将 48 份伪狂犬病阴性血清按最佳工作条件进行 ELISA 测定, 对其结果进行统计学分析, 48 份阴性血清 OD 值平均数(\bar{X})等于 0.039, 方差(S)等于 0.037, 取 99% 置信区间“ $\bar{X} + 3S$ ”等于 0.15, 由此得出 gE-ELISA 的判定标准, 即 OD 值大于 0.15 者判为阳性(其 OD 值分布直方图见图 8)。

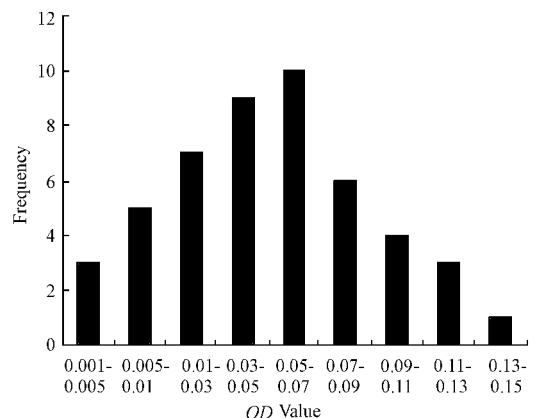


图 8 伪狂犬病阴性血清 gE-ELISA OD 值分布直方图

Fig.8 OD Values of PRV negative swine sera determined by tgE-ELISA

2.4 tgE-ELISA 对现地送检血清样品的检测及与中和试验、单抗竞争 ELISA 试验的比较

对山东、辽宁等省市未接种 gE 基因缺失疫苗猪场的送检血清同时用病毒中和试验(SN)、tgE-ELISA、全病毒 ELISA 等方法进行检测,结果见表 1。

对河北、辽宁锦州、哈尔滨三地说送的猪场(接种过 gE 基因缺失疫苗)血清样品进行 gE-ELISA 和 SN 检测,并与国外用于检测 gE 抗体的单抗竞争性 ELISA 检测结果相比较(结果见表 2)。

对比实验证明 tgE-ELISA 与全病毒 ELISA 特异性、敏感性相近,比 SN 敏感性更好。与单抗竞争性 ELISA 相符性在 94% 左右。

表 1 对现地猪场送检血清样品的检测

Table 1 Comparative detection of swine sera from unvaccinated herds with tgE-ELISA, SN, or PRV-ELISA

Sources of samples	Harbin	Liaoning	Hebei	Peking	Shandong	Jilin
Number detected	293	15	33	55	9	12
The positive ratio by tgE-ELISA	63%	73%	46%	0%	0%	42%
The coincidental ratio of tgE-ELISA and PRV-ELISA	95%	97%	100%	100%	100%	100%
The coincidental ratio of tgE-ELISA and SN	90%	87%	94%	100%	100%	83%

表 2 对现地接种疫苗猪场血清样品的检测结果

Table 2 Comparative detection of swine sera from gE-deleted PRV vaccine immunized herds with tgE-ELISA and competitive McAb-ELISA

Provinces	Harbin	Liaoning	Hebei
Number detected	51	14	20
The positive ratio by tgE-ELISA	88%	71%	70%
The coincidental ratio with McAb-ELISA	95%	93%	95%

3 讨论

gE 基因是伪狂犬病病毒的主要毒力相关基因,而 gE 基因缺失的 PRV 弱毒株也是包括我国在内的世界各国广泛使用的 PRV 弱毒疫苗。当前一些主要伪狂犬病流行国家在应用 gE 基因缺失疫苗预防伪狂犬病的同时,配合以针对 gE 蛋白的鉴别诊断方法区分自然感染猪和疫苗免疫猪,逐步实现了伪狂犬病的根除。本研究以 gE 基因作为标记基因建立了与我国广泛使用的 gE 基因缺失弱毒疫苗相配套的鉴别诊断方法,为今后在我国启动 PRV 根除计划

创造了技术条件。

最早建立伪狂犬病鉴别诊断 ELISA 的是荷兰学者 Van Oirschot,他于 1986 年建立了阻断免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)用于区分野毒感染猪和疫苗免疫猪^[3]。虽然 IPMA 能起到有效的鉴别诊断,但是其操作过程复杂、要求条件高,不适合配合根除计划。随后 Van Oirschot 等又建立了一种单抗阻断 ELISA 诊断方法,相比于 IPMA,ELISA 诊断方法特异性强、敏感性好,而且操作过程简单,适合于大批量的检测,可有效配合根除计划^[12]。在与中和试验、常规 ELISA 对比试验中,阻断 ELISA 可检测到攻毒后 2 周的 gE 抗体,且至少可以维持 7 个月以上。此外 Mellencamp 等用亲和层析分离纯化 gE 抗原,建立了 gE-ELISA,可有效鉴别常规血清学方法难以区分的野毒感染和疫苗接种感染^[13]。而 Ro 等在大肠杆菌表达系统中高效表达了 PRV gE 77-210 共 134 个氨基酸残基,将表达产物纯化后包被 ELISA 板建立的鉴别诊断技术与经亲和纯化的天然 gE 所建立的 ELISA 效果相近^[8]。在本次实验中,我们将伪狂犬病 gE 基因去除信号肽和跨膜区的包含有全部免疫活性表位的全部序列共 315 个氨基酸残基在大肠杆菌中高效表达,利用纯化的表达产物建立了 tgE-ELISA 鉴别诊断技术。

在 tgE 的初期表达中,蛋白表达量大,相互聚集形成了很难溶解的包涵体形式。为此我们将诱导的条件进行了优化选择,结果发现在低温 25℃ 条件下降低诱导剂 IPTG 的浓度可以有效抑制包涵体的形成,促进蛋白的可溶性表达。在所表达的蛋白中我们融合了谷胱甘肽转移酶标签,标签蛋白大小为 29kD,为避免其可能对检测结果造成的影响,在纯化过程中我们进一步用 PreScission 蛋白酶对标签进行了剪切,去除标签后蛋白大小约为 34kD。

通过对间接 ELISA 抗原的包被量、血清的稀释倍数和作用时间以及影响反应结果的显色时间等因素的优化,我们确定了 tgE-ELISA 的最佳工作条件。经交叉试验证实 tgE-ELISA 与猪其它 8 种疫病阳性血清及 SPF 猪血清没有交叉反应,通过对背景明确的 48 份阴性血清的检测最终确定了 tgE-ELISA 的临界值。同时批内、批间重复性试验证实,抗体水平不同的各血清样品 tgE-ELISA OD 值变异程度不大,重复性较好。经过对 400 余份送检血清样品的检测,同时与中和试验和全病毒 ELISA 试验检测的结果相对比,结果 tgE-ELISA 与中和试验相符性达 90% 以上,而与全病毒 ELISA 相符性达 95% 以上,这间接

也证明了 tgE-ELISA 敏感性要好于中和试验,同全病毒 ELISA 接近^[14]。此外,与单抗竞争性 ELISA 同时对疫苗免疫猪场检测,结果相符性在 94% 左右,证明了 tgE-ELISA 的检测能力与竞争性 ELISA 相近。因此,本实验建立的 tgE-ELISA 鉴别诊断方法适用于伪狂犬病病毒 gE 基因缺失疫苗免疫的猪和伪狂犬病病毒自然感染猪的鉴别诊断。

REFERENCES(参考文献)

[1] Nauwynch H J. Functional aspects of Aujeszky 's disease(Pseudorabies)viral proteins with relation to invasion , virulence and immunogenicity . *Vet Microbiol* ,1997 , **55** 3 - 11

[2] Van Oirschot J T , Rziha H J , Moonen P J L M *et al* . Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky 's disease virus by a competitive enzyme immunoassay . *J Gen Virol* , 1986 **67** :1179 - 1182

[3] Osorio F A. Diagnosis of Aujeszky 's disease . *In Aujeszky 's disease (OIE symposium)* , 1994 , pp.33 - 43

[4] Van Nes A. Mathematical modelling of pseudorabies virus(syn. Aujeszky 's disease virus) outbreaks aids eradication programmes : a review . *Vet Q* , 2001 , **23**(1) 21 - 26

[5] Elbers AR , Braamskamp J , Dekkers LJ *et al* . Aujeszky 's disease virus eradication campaign successfully heading for last stage in The Netherlands . *Vet Q* , 2000 , **22**(2) :103 - 107

[6] Tirabassi R S , Townley R A , Eldridge M G *et al* . Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE evidence for envelope incorporation , virulence and neurotropism domains . *J Virol* , 1997 , **71** :6455 - 6464

[7] Ran Z (冉智光) , Tong G (童光志) , Kong L (孔令达) *et al* . Development of a PCR for differentiating vaccinated swine from pseudorabies virus infected ones . *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*(中国畜禽传染病) , 1998 **2** :108 - 111

[8] Ro LH , Lai SS , Hwang WL *et al* . Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays . *Am J Vet Res* , 1995 , **56**(5) 555 - 561

[9] Kimman TG , de Leeuw O , Kochan G *et al* . An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using baculovirus-expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method with blocking ELISAs . *Clin Diagn Lab Immunol* , 1996 , **3**(2) :167 - 74

[10] Tirabassi RS , Enquist LW. Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion , virulence , and posttranslational N-linked glycosylation . *J Virol* , 2000 , **74**(8) 3505 - 16

[11] Morenkow OS , Fodor N , Sobko YA *et al* . Immunological characterization of glycoprotein E of Aujeszky 's disease virus . *Virus Res* , 1997 , **51**(1) 65 - 79

[12] Van Oirschot JT , Houwers DJ , Rziha HJ *et al* . Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky 's disease virus : a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs . *J Virol Methods* , 1988 , **22**(2 - 3) :191 - 206

[13] Mellencamp MW , Pfeiffer NE , Suiter BT *et al* . Identification of pseudorabies virus-exposed swine with a gI glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay . *J Clin Microbiol* , 1989 , **27**(10) 2208 - 2213

[14] Van Oirschot JT , Oei HL. Comparison of two ELISAs for detecting antibodies to glycoprotein I of Aujeszky 's disease virus . *Vet Rec* , 1989 , **125**(3) 63 - 64

Expression of Truncated gE Gene of Pseudorabies Virus(PRV) and Primary Application in Differential Diagnosis of PRV Vaccination and Infection

NI Jian-Qiang ZHANG Chun-Ling TONG Guang-Zhi* QIU Hua-Ji WANG Yun-Feng TIAN Zhi-Jun
(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , CAAS , Harbin 150001 , China)

Abstract With the application of gE gene deleted pseudorabies virus(PRV) vaccine worldwide , a corresponding differential diagnosis based on gE glycoprotein is needed in the project of PRV eradication . In this study , PRV gE gene without signal and transmembrane region was amplified by PCR and cloned into pGEX-6P-1 , generated pGEX-gE . After transformation of BL21 with pGEX-gE , an expressed fusion protein(about 63kD) was identified by SDS-PAGE . The recombinant proteins are produced as inclusion bodies . By changing the inductive conditions , the formation of inclusion bodies was inhibited and tended to increase the percentage of soluble recombinant protein . The antigenic reactivity of the recombinant protein was confirmed by Western blotting with polyclonal antibodies against PRV . Using purified recombinant tgE as antigen , an ELISA was developed to detect sera of PRV infected pigs and sera of pigs immunized with gE-deleted PRV vaccine . The total of 400 serum samples collected from field were comparatively tested with the tgE-ELISA and a commercial competitive ELISA based on monoclonal antibody against gE , the results indicated that the coincidental rate between the two tests is about 94% .

Key words Pseudorabies virus(PRV) , gE , differential diagnosis

Received : 11-20-2003

This work is supported by National High-Tech Plan(863 Plan)(2001AA213051) .

* Corresponding author . Tel 86-451-82734181 ; Fax 86-451-82734181 ; E-mail : gztong@public.hi.nj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn