

# 牛传染性鼻气管炎病毒 gG 蛋白的表达及 gG-ELISA 的建立 Infectious Bovine Rhinotracheitis Viral gG Expression and gG-ELISA Development

颜邦芬<sup>1,2</sup> 陈 钺<sup>1,2</sup> 张书环<sup>1,2</sup> 林祥梅<sup>3</sup> 陈颖钰<sup>1,2</sup> 晁彦杰<sup>1,2</sup> 李德学<sup>4</sup> 宋念华<sup>4</sup> 陈焕春<sup>1,2</sup> 郭  
爱珍<sup>1,2\*</sup>

YAN Bang-Fen<sup>1,2</sup>, CHEN Zeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu-Huan<sup>1,2</sup>, LIN Xiang-Mei<sup>3</sup>, CHEN Ying-Yu<sup>1,2</sup>, CHAO  
Yan-Jie<sup>1,2</sup>, LI De-Xue<sup>4</sup>, SONG Nian-Hua<sup>4</sup>, CHEN Huan-Chun<sup>1,2</sup> and GUO Ai-Zhen<sup>1,2\*</sup>

1 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070

2 华中农业大学预防兽医学湖北省重点实验室 华中农业大学动物医学院 武汉 430070

3 中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所 北京 100029

4 湖北省动物疫病诊断中心 武汉 430064

1 The State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

2 The Hubei Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

3 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Institute of Animal and Plant Quarantine, Beijing 100029, China

4 Hubei Diagnosis Center of Animal Diseases, Wuhan 430064, China

**摘 要** 以牛传染性鼻气管炎病毒( IBRV)基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 gG 基因, 克隆到 T 载体 pMD18-T, 经限制性酶切分析及序列测定鉴定正确后, 进一步亚克隆至原核表达载体 pGEX-KG。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明, 该基因在大肠杆菌 BL21( DE3) 中呈可溶性及包涵体两种形式表达, 重组蛋白质具有免疫学活性。包涵体蛋白经提纯、变性、复性后, 作为包被抗原建立了 gG-ELISA 诊断方法。应用该方法与进口试剂盒( IDEXX)平行检测 380 份血清样品, 两种方法的符合率为 92%( 351/380)。对 6 份病毒分离阳性血清的检测均为阳性, 对非相关病原的阳性血清及中监所的阴性血清检测均为阴性, 表明所建立的 IBRV gG 抗体的 ELISA 检测具有良好的灵敏度与特异性。对 1248 份奶牛血清样本进行了检测, 进口牛群的 IBRV 抗体阳性率平均为 21.7%, 湖北本地中国黑白花奶牛的抗体阳性率在不同牧场之间变化很大, 范围为 0.0% ~ 41.5%。

**关键词** 牛传染性鼻气管炎病毒, gG 基因, ELISA, 原核表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061( 2007) 05-0806-06

**Abstract** Taking the genome DNA of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus ( IBRV ) as the template, the gG gene was amplified with PCR and cloned into the T cloning vector pMD18-T. After being identified by restriction digestion and DNA sequencing, the insert was subcloned into the expression vector pGEX-KG. Sodium docecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ( SDS-PAGE ) and Western blot assay showed that this gene was expressed as both soluble form and inclusion body by the transformed *E. coli* BL21 strain ( DE3 ). The fusion protein was purified and used as the coating antigen to develop the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ( ELISA ). Comparison between this gG-ELISA and commercial IBRV gB-ELISA

Received : January 10, 2007 ; Accepted : March 12, 2007.

This work was supported by the grant from the " Eleventh Five-years " National Key Technology R&D Program Dairy Key Project ( No. 2006BAD04A12 ).

\* Corresponding author. Tel : + 86-27-87286861 ; Fax : + 86-27-87281795 ; E-mail : aizhen@mail. hzau. edu. cn

国家“ 十一五 ” 科技攻关奶业重大专项( No. 2006BAD04A12 )

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

Kit (IDEXX) was made in the detection of 380 cow serum samples. The results demonstrated an agreement of 92%. By using this novel gG-ELISA, 1248 cow serum samples were tested and the average positive rate of IBRV antibodies for imported cows is 21.7%, while the positive rate ranged greatly from 0.0% ~ 41.5% for Hubei local Chinese Black and White Dairy Cows.

**Key words** Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, gG gene, ELISA, prokaryotic expression

牛传染性鼻气管炎 (Infectious Bovine Rhinotracheitis, IBR) 是由牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV) 引起的牛的一种急性、热性、接触性传染病。该病毒为 I 型牛疱疹病毒, 具有广泛的组织嗜性, 临床上以上呼吸道炎症为主, 但可表现出多种症状, 如发热、鼻气管炎、结膜炎、生殖道粘膜病变、流产、脑炎等。上世纪 50 年代在美国首次发现本病并分离到病毒。目前除丹麦与瑞典外, 该病在世界范围内流行, 对牛的肥育率、产奶量和繁殖率影响极大, 给养牛业造成了严重危害<sup>[1]</sup>。IBRV 具有潜伏感染与持续带毒排毒的特征, 近年来进口奶牛及精液与胚胎已成为扩大奶牛养殖规模、改良我国奶牛地方品种的重要举措, 如 2004 年进口奶牛就达 11 万之多, 奶牛 IBR 在我国的流行风险日益加大。厦门出入境检验检疫局检测了 2005 年初进口的 3000 头奶牛发现, IBR 抗体阳性率为 42% (1293/3000)<sup>[2]</sup>, 广州出入境检验检疫局对 5000 头进口种牛检疫, 结果血清抗体阳性率为 30% (1505/5000)<sup>[3]</sup>。我国 1980 年从新西兰进口奶牛中首次分离到该病毒<sup>[4]</sup>, 此后, 各口岸均相继从抗体阳性、无临床表现的进口牛中分离到病毒<sup>[3-5]</sup>。

与此同时, 国内一些血清学调查表明, 我国广东、广西、河南、河北、山东、新疆、四川、贵州等地区都有 IBRV 血清阳性牛群。2004 年贵州省四个地区的流行病学调查表明, 当地的血清抗体阳性率为 5.4%<sup>[6]</sup>, 青海省刚察地区的当地奶牛血清阳性率为 30.6%<sup>[7]</sup>。其它地区的牛群感染情况有待进一步了解。

IBR 的诊断方法包括分离病毒, 免疫荧光法检测抗原, 中和试验、琼脂扩散试验、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等检测血清抗体, PCR 及荧光定量实时 PCR 检测病毒核酸等<sup>[1]</sup>。ELISA 因为方便、快速、易于自动化, 是流行病学调查与临床初诊的首选方法。当前国外普遍使用的 IBR 控制手段包括使用缺失毒力基因 (*tk*) 与非必需基因 (*gE*) 的基因工程弱毒疫苗与配套的 gE-ELISA 分子鉴别诊断方法。国内也有学者建立了 gE-ELISA, 但尚无产品问世<sup>[8]</sup>。本研究以糖蛋白 G (gG) 为靶蛋白, 克隆和表达了 gG 基因, 并利用表达产物建立了 gG-ELISA

方法。糖蛋白 G 是病毒复制非必需的分泌性蛋白, 可影响病毒在宿主细胞内有效增殖与细胞间扩散, 与病毒毒力相关, 被广泛用于其它疱疹病毒的诊断抗原<sup>[9-11]</sup>。研究 gG-ELISA 及配套的 gG 基因缺失疫苗, 可为我国控制可能的 IBR 流行提供工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒与菌种:** 牛传染性鼻气管炎病毒 Bartha Nu67 株及牛肾细胞系细胞 (Madin-Darby bovine kidney, MDBK) 购于中国兽药监察所。E. coli DH5 $\alpha$  菌株和 E. coli BL21 菌株由本室保存。

**1.1.2 质粒及相关试剂:** pMD18-T 载体、Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及相关限制酶均购自大连宝生物工程公司。pGEX-KG 由本室保存。UNIQ-10 柱式离心式 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。

**1.1.3 参考血清和酶标抗体:** IBR 阳性和阴性血清均购自中国兽药监察所, 口蹄疫阳性血清购于兰州兽医研究所, 辣根过氧化物酶标记羊抗牛 IgG 购于晶美生物公司, BHV-1 抗体检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司。

**1.1.4 血清样本:** 共收集 1254 份奶牛血清。765 份中国黑白花奶牛血清, 分别来自于湖北省内 1 个奶牛小区、1 个 1000 头规模化养殖场与 4 个 100 头左右中型奶牛场。483 份血清来自于进口荷尔斯坦奶牛群。6 份血清来自于病毒分离阳性奶牛, 由黑龙江八一农垦大学侯喜林教授惠赠。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒增殖与纯化:** 将适量 IBRV Bartha Nu/67 株病毒接种至 MDBK 细胞中, 48 ~ 72h 后, 待 80% 以上细胞出现病变时收获细胞培养物, 冻融 3 次, 低速离心去除细胞碎片, 上清液进行低温超速离心 (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, SW28 rotor, 27000 r/min  $\times$  120min)。沉淀用少量 TEN (100.0mmol/L NaCl, 10.0mmol/L Tris-HCl, 1.0mmol/L EDTA, pH8.0) 缓冲液溶解后, 铺于预先制备好的 20% ~ 60% 的连续蔗糖梯度上, 超速离心 (离心机型号及转头号同上, 23400r/min  $\times$  120min), 收集介于 40% ~ 50% 之间

的病毒带,超速离心(离心机型号及转头号同上,27000r/min × 120min)脱糖,沉淀用少量 TEN 溶解<sup>[12]</sup>。纯化的病毒经 2% 磷钨酸负染后,用电子显微镜(HITACHI H-7000FA ELECTRON MICROSCOPE)观察病毒粒子的形态特征。

**1.2.2 模板制备** 在纯化的病毒液中加入终浓度为 0.5% 的 SDS、5mmol/L EDTA、100 $\mu$ g/mL 蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 过夜,用酚/氯仿混合物和氯仿各抽提 1 次,上清中的 DNA 用无水乙醇沉淀,75% 乙醇洗涤 DNA 沉淀,抽干,溶解于适量灭菌双蒸水中,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.3 引物设计与合成** 根据 GenBank 上发表的牛传染性鼻气管炎病毒 Bartha Nu/67 株 gG 基因的全长核苷酸序列(NC001847),设计一对引物,并在 5' 端分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。引物由上海生工合成。引物序列为: Forward: P1 5'-TGAGGATCCATGCCTGCCGCCCG-3'; Reverse: P2 5'-TGCAAGCTTTCAGACGCTGAGCAT-3'。

**1.2.4 gG 基因的 PCR 扩增和回收** PCR 反应体系体积为 50 $\mu$ L;其中模板 DNA 1 $\mu$ L,dNTP 2 $\mu$ L,DMSO (或甘油)5 $\mu$ L,10 × Buffer 5 $\mu$ L,引物 P1、P2 各 1 $\mu$ L,Taq 酶 1 $\mu$ L,加双蒸水至 50 $\mu$ L。扩增后取 8 $\mu$ L 产物于 0.8% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,回收 1.3kb 的片段。

**1.2.5 gG 基因的克隆与测序质粒的构建** 将纯化的 PCR 产物连接于 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取单菌落培养后,以碱裂解法提取少量质粒,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切质粒后于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,回收 1.3kb 的片段,与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的 pGEX-KG 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  按同样方法抽提少量质粒,双酶切及 DNA 测序鉴定。

**1.2.6 gG 基因的表达、纯化及 Western blot 分析** 将测序正确的质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),0.8mmol/L IPTG 诱导,于不同时间取样,SDS-PAGE 电泳鉴定表达蛋白,确定最佳诱导时间和温度。按照分子克隆<sup>[13]</sup>介绍的方法提取包涵体,并进行复性处理。将表达蛋白经 SDS-PAGE 分离,半干法转移至硝酸纤维素膜上,用含 1% BSA 和 5% 脱脂乳的 TBST 封闭,用牛抗 IBRV 高免血清为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗牛 IgG 为二抗,DAB 显色。

**1.2.7 ELISA 诊断方法的建立** 以纯化的 gG 重组蛋白为包被抗原、酶标羊抗牛 IgG 为二抗建立检测血清 IBRV 抗体的间接 gG-ELISA,其主要步骤如下:

将纯化好的重组 gG 蛋白用碳酸盐缓冲液(0.05mol/L CBS,pH9.6)作适当稀释,包被聚苯乙烯微量反应板(深圳市金灿华实业有限公司),4 $^{\circ}$ C 过夜,每孔加入 300 $\mu$ L 封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST)作用 1h;将待检血清样品作适当稀释后,按 100 $\mu$ L/孔加入反应板,37 $^{\circ}$ C 作用 45min;酶标羊抗牛抗体作适当稀释后,按 100 $\mu$ L/孔加入反应板,37 $^{\circ}$ C 作用 45min。上述步骤之间均用洗涤液(含 0.05% Tween-20 的 PBS,pH7.4)进行充分洗涤。加入 TMB 底物显色液(TMB 贮存液用底物缓冲液按 1:20 的比例稀释,每毫升底物液加入 0.2 $\mu$ L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),避光显色一定时间以后,用终止液(0.25% HF)终止反应,测定每孔吸收值(*OD*<sub>630</sub>值),进行结果分析。

**判定标准的确定** 选取 60 份经进口试剂盒检测为阴性的奶牛血清,进行 gG-ELISA 检测。计算该 60 份血清的平均值  $X$  与标准差  $SD$ ,样品  $OD$  值  $\geq X + 2SD$  判为阳性, $OD$  值  $< X + 2SD$  则判为阴性。

**重复性试验** 按照参考文献[14]方法,取相同批次抗原包被酶标板条 6 条,及 6 个不同批次抗原包被酶标板条各 6 条,分别检测 6 份抗体水平不同的血清样品,每样本重复 6 次。计算批内和批间变异系数。

**特异性试验** 用 gG-ELISA 分别检测牛口蹄疫阳性血清、牛病毒性腹泻阳性血清、牛结核阳性血清、牛巴贝斯虫病阳性血清、牛附红细胞体阳性血清、牛布氏杆菌病阳性血清。

**敏感性试验** 用商品化 IBRV 竞争 gB-ELISA 试剂盒(美国 IDEXX 公司)与本研究建立的 gG-ELISA 诊断方法同步检测 380 份由本室保存的血清样品,计算敏感性与符合率。

**临床样本检测** 用 gG-ELISA 方法对试验室保存的 1248 份奶牛血清进行检测,包括进口奶牛血清与湖北中国黑白花奶牛血清,以评价 IBRV 血清抗体阳性率。

## 2 结果

### 2.1 病毒纯化结果

用蔗糖密度梯度离心纯化病毒,负染后电镜观察,病毒粒子近似圆形,约为 150nm,具有囊膜,符合 IBRV 的典型形态特征。

### 2.2 PCR 扩增和克隆结果

以 IBRV Bartha Nu/67 株纯化病毒总 DNA 为模板,扩增出一条约 1.3kb 的特异性片段,与预期大小相符。回收之后连接到 pMD18-T 载体,用 *Bam*H I

和 *Hind* III 双酶切,回收 1.3kb DNA 片段,克隆至 pGEX-KG 载体,得到重组质粒 pGEX-gG。测序结果显示 gG 基因序列为 1335bp,包括了从 ATG 至 TGA 的完整阅读框,与 GenBank 登陆序列 IBRV Bartha Nu/67( NC001847 )的同源性为 100%。

### 2.3 gG 在大肠杆菌中的表达与检测

将鉴定正确的 pGEX-gG 转化 BL21( DE3 ), 0.8mmol/L IPTG 诱导,将全菌进行 SDS-PAGE,结果显示 pGEX-gG 与空载体转化菌株相比,重组质粒转化菌在约 73kD 处多出现一明显的蛋白条带,其大小与预期相当,而对照在 26kD 处出现一特征性条带,与标签 GST 大小相符(图 1)。从诱导 3h 的菌液中提取包涵体,上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳,结果发现,沉淀和上清中都有目的蛋白。对诱导的菌液以不同时间取样以及用不同的温度诱导,目的带的表达量没有明显差异。

超声波破碎 IPTG 诱导 3h 的菌体,上清用 Glutathione 4B 亲和层析纯化,结果没有得到目的蛋白。对包涵体进行纯化,并进行 Western blot 分析,结果 pGEX-gG 转化菌在约 73kD 处出现了阳性条带,对照 pGEX-KG 在相应位置为阴性(图 1),说明 gG 基因在 BL21( DE3 )中获得了正确表达,并且具有免疫原性。

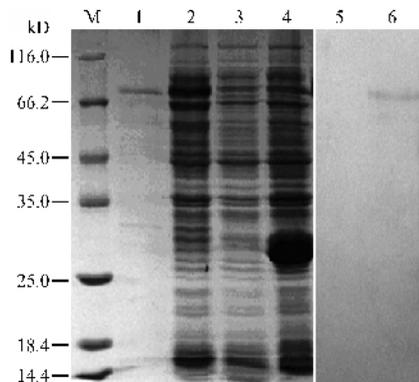


图 1 SDS-PAGE 及 Western blot 检测重组蛋白 gG 的表达与免疫原性

Fig.1 The expression of gG recombinant protein analyzed with SDS-PAGE and Western blot

M:reference protein marker SM-0431 ( MBI ) with the molecular mass on the left ; 1 :The purified fusion protein GST-gG ; 2 :lysate of *E. coli* transformed by pGEX-gG after IPTG induction ; 3 :lysate of *E. coli* transformed by pGEX-gG before induction ; 4 : lysate of *E. coli* transformed by blank vector showing the tag ( GST ) expression after IPTG induction as negative control ; 5 :supernatant of *E. coli* transformed by blank vector as negative control ; 6 :protein expressed by pGEX-gG.

## 2.4 gG-ELISA 诊断方法的建立

### 2.4.1 ELISA 最适条件及阴阳界限的确定 :经方阵

滴定确定抗原最佳包被浓度为 1 : 640 ,相当于 0.585μg/孔 ;血清最佳稀释度为 1 : 50 ;底物最佳作用时间为 10min。60 份阴性血清  $OD_{630}$  值为  $X \pm 0.025$  ,求得阴阳界限为 0.299。因此判定标准定为 :以空白孔调零,在酶标仪上测定各孔  $OD_{630}$  值, $OD_{630} \geq 0.299$  判为血清抗体阳性, $OD_{630} < 0.299$  则判为阴性。

### 2.4.2 pGEX-KG 空载体表达蛋白工作浓度的确定 :

pGEX-KG 空载体经 IPTG 诱导表达,超声波破碎后离心,将上清液加入血清稀释液中,使之含量( V/V )分别为 0% , 0.5% , 1.0% , 1.5% , 2.0% , 2.5% , 3.0% ,同时设阴性、阳性、空白对照,其他条件完全一致,进行试验。结果表明,空载体表达蛋白含量为 1.0% 时,可达到最佳中和效果,即可最大程度地消除非特异性反应。

### 2.4.3 重复性试验

利用相同批次抗原包被酶标板条与不同批次抗原包被酶标板条检测 6 份抗体水平不同的血清样品,结果批内变异系数在 3.5% ~ 8.8% 之间,批间变异系数在 4.5% ~ 9.1% 之间,说明此诊断方法具有良好的重复性(表 1)。

表 1 gG-ELISA 重复性试验  
Table 1 The results of repetition test for gG-ELISA

In-batch CV/%	8.8	3.5	5.9	8.6	6.7	7.1
Between batch CV/%	9.1	4.5	6.2	7.3	7.0	5.4

### 2.4.4 特异性试验 :

用 gG-ELISA 检测了牛口蹄疫阳性血清、牛病毒性腹泻阳性血清、牛结核阳性血清、牛巴贝斯虫病阳性血清、牛附红细胞体阳性血清、牛布氏杆菌病阳性血清、牛传染性鼻气管炎病毒阴性血清,结果均为阴性,而在相同条件下检测牛传染性鼻气管炎病毒阳性血清,结果则为阳性,表明此方法特异性良好(表 2)。

表 2 gG-ELISA 特异性试验  
Table 2 The results of specificity test for gG-ELISA

Diseases	Negative serum		Reference positive sera					
	IBR	FMD	BVD	BT	BB	BED	Br	IBR
$OD_{630}$	0.112	0.149	0.137	0.203	0.117	0.185	0.26	0.511

Note 1. FMD :bovine foot and mouth disease ; 2. BVD : bovine viral diarrheo-mucosal disease ; 3. BT :Bovine Tuberculosis ; 4. BB :Babesia Bovis ; 5. BED : bovine Eperythrozoon disease ; 6. Br :bovine brucellosis ; 7. IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis.

### 2.4.5 敏感性试验 :

用美国 IDEXX 公司的 IBRV 竞争 gB-ELISA 试剂盒与本研究建立的 gG-ELISA 同步检测 380 份本室保存的奶牛血清样品,结果,本试剂盒的阳性检出率为 20.26% ,gB-ELISA 的阳性检出率为 18.95%。两种方法的阳性符合率或敏感性为 83%( 60/72 ) ,阴性符合率为 94%( 291/308 ) ,总符合

率为 92% (351/380) (表 3、表 4)

表 3 gG-ELISA 与商品试剂盒 gB-ELISA (IDEXX) 的比较试验

Table 3 Comparison test between gG-ELISA and commercial gB-ELISA (IDEXX)

	Commercial gB-ELISA			
	Positive	Negative	Total	
gG-ELISA	Positive	60	17	77
	Negative	12	291	303
	Total	72	308	380

表 4 gG-ELISA 与商品试剂盒 gB-ELISA (IDEXX) 对 380 份血清的检测结果

Table 4 The results of gG-ELISA and commercial gB-ELISA (IDEXX)

	gB-ELISA <sup>a</sup>		gG-ELISA <sup>b</sup>	
	n	$\bar{X} \pm SD$	n	$\bar{X} \pm SD$
Positive	72	0.077 ± 0.062	77	0.443 ± 0.115
Negative	308	0.996 ± 0.158	303	0.151 ± 0.068

a competitive ELISA b indirect ELISA.

用 gG-ELISA 与 gB-ELISA (IDEXX) 对 6 份病毒分离阳性奶牛血清进行检测, 结果均为阳性。

2.4.6 gG-ELISA 血清抗体检测的应用 除临床病毒分离确定为阳性的 6 份血清外, 用所建立的 gG-ELISA 对实验室保存的其余 1248 份血清进行了检测。结果发现, 进口牛群的 IBRV 抗体阳性率平均为 21.7%。湖北本地中国黑白花奶牛的 IBRV 抗体阳性率在不同牧场之间变化很大 (0.0% ~ 41.5%) (表 5)。

表 5 奶牛血清样本 IBRV 抗体检测

Table 5 IBRV antibody detection for cow serum samples

Groups	Total number (heads)	Positive number (heads)	Positive rate (%)
1	441	121	27.4
2	63	5	7.9
3	33	0	0.0
4	129	12	9.3
5	34	5	14.7
6	65	27	41.5
7*	483	105	21.7
Total	1248	275	22.0

\* Improved cows.

### 3 讨论

尽管牛传染性鼻气管炎是一种呈世界流行的病毒性传染病, 给养牛业造成严重危害<sup>[1]</sup>, 我国尚未发现牛传染性鼻气管炎的流行。导致我国关注 IBRV 的直接原因是奶牛进口, 如我国 1980 分离的第一株 IBRV 病毒分自于进口奶牛, 以后报道的临床病毒分离研究也多来自于出入境检验检疫机构, 而且病毒

多分自于抗体阳性、临床表现健康的带毒牛<sup>[2-5]</sup>。由于 IBRV 具有潜伏感染和间歇排毒的特征, IBRV 初次感染牛后, 病毒粒子沿感觉神经纤维上行, 到颅神经或脊髓神经节内潜伏下来, 可能终生带毒, 也可能在应激条件下激活, 导致临床发病<sup>[15]</sup>。随着我国奶牛业的蓬勃发展, 出于品种改良等目的, 我国还在不断引进奶牛。进口牛群引入 IBRV 的风险可谓防不胜防。本研究对部分进口牛群的血清学调查也证实了这一观点。

然而, 国内本地牛群 IBRV 流行的风险也不容忽视。从本研究的奶牛血清流行病学调查结果看, 所调查的湖北地区大部分牧场均有不同比例的 IBRV 抗体阳性牛, 从 7.9% 到 41.5%。这一结果证实了其它研究者有关 IBRV 抗体阳性率为 5.4% ~ 30.6% 的报道<sup>[6,7]</sup>。由于目前在全国范围内的 IBRV 流行病学资料尚不清楚, 有必要进一步扩大调查范围, 以全面了解牛群的感染状况, 防患于未然。

鉴于 IBRV 对我国牛群的潜在危害, 加强对 IBRV 抗体阳性牛的检测与监控迫在眉睫。然而, 由于中和试验等经典方法烦琐费时, 目前主要依靠价格昂贵的进口 ELISA 试剂盒进行检测与诊断, 国内自主研发的检测方法极少。gG 是 IBRV 的主要囊膜糖蛋白之一, 具有很强的抗原性<sup>[16]</sup>, 是许多疱疹病毒的诊断抗原, 被广泛用于其它疱疹病毒感染性疾病的血清学诊断<sup>[17]</sup>。本试验成功建立了检测 IBRV 血清抗体的 gG-ELISA 诊断方法, 对 IBRV 阳性参考血清、病毒分离阳性的 6 份临床血清的检测均为阳性, 对非相关病原的阳性参考血清的检测均为阴性, 显示该诊断方法具有良好的敏感性与特异性。

比较本研究建立的 gG-ELISA 与 IDEXX 公司商业化 gB-ELISA 试剂盒的检测结果, 发现两种方法具有较高的符合率 (92%), 证实所建立的方法可以用于临床检测。IBRV 的 gB 蛋白是疱疹病毒科中最保守的蛋白, 是一种必需蛋白, 在其所有组成蛋白中具有最高的同源性, 常被用作诊断抗原。但该蛋白与单纯疱疹病毒 (HSV-1) 具有免疫交叉反应<sup>[18]</sup>, 且不能用作鉴别诊断。而 gG 是一种病毒复制非必需的分泌性蛋白, 以此建立的检测方法有望与基因工程标记疫苗配套使用, 以区分野毒感染与疫苗接种病毒。然而, 由于本研究使用抗原为包涵体纯化抗原, 纯度不高, 因此检测时本底偏高。尽管空载体转化大肠杆菌吸附血清能有效降低检测背景, 但操作较为烦琐。进一步提高重组抗原的纯度, 有望提高检测灵敏度, 简化操作程序, 便于推广应用。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Liu XY(刘欣晏),Feng WG(冯卫国),Wu CI(吴春涛). The progress in studies on the infectious bovine rhinotracheitis. *Shandong Science* (山东科学) 2006, **19** (6) 65 - 69.
- [ 2 ] Kong FD(孔繁德),Xu SF(徐淑菲),Zhou BH(周斌华),*et al.* Isolation and identification of the infectious bovine rhinotracheitis of imported cow. *Chinese Journal of Animal Quarantine*(中国动物检疫) 2006, **23** (4) :19 - 30 .
- [ 3 ] Luo Q(罗琼),Li LS(李力施),Chen R(陈茹),*et al.* The isolation of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus from imported breeder cow. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*(中国兽医杂志) 2005, **41** (9) 45 - 46.
- [ 4 ] Zhou TC(周泰冲),Ye ZM(叶章明),Li SQ(黎少权),*et al.* The isolation of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus from the cows imported from the New Zealand. *Journal of Veterinary Medicine Science and Technology* (兽医科技杂志),1981, **1** 6 - 9.
- [ 5 ] Tang TS(唐泰山),Wang KM(王凯民),Deng BH(邓碧华),*et al.* Isolation and identification of one strain of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Progress in Veterinary Medicine*(动物医学进展) 2006, **27** (6) 69 - 71.
- [ 6 ] Ai YH(艾玉萍),Tan SW(谭诗文),Ran MT(冉懋韬),*et al.* The serological investigation of Bovine Rhinotracheitis Virus in Guizhou province. *Shanghai Bulletin of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*(上海畜牧兽医通讯) 2004, **5** :19.
- [ 7 ] Yang CM(杨春明). The serological investigation of Bovine Rhinotracheitis in Gang Cha area. *Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*(青海畜牧兽医杂志) 2003, **33** (2) 39.
- [ 8 ] Wang HY(王海燕),Zhu YM(朱远茂),Xue F(薛飞),*et al.* Indirect enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant glycoprotein E of infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) 2005, **25** (12) 29 - 33.
- [ 9 ] Nakamichi K ,Matsumoto Y ,Otsuka H. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* 2002, **294** (1) 22 - 30.
- [ 10 ] Nakamichi K ,Kuroki D ,Matsumoto Y ,*et al.* Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. *Virology* 2001, **279** (2) 488 - 498.
- [ 11 ] Sascha Trapp , Nikolaus Osterrieder , Günther M Keil , *et al.* Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome :analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *Virology* 2003, **84** 301 - 306
- [ 12 ] Wong ML ,Chen CH. Evidence for the internal location of actin in the pseudorabies virion. *Virus Research* ,1998, **56** (2) :191 - 197.
- [ 13 ] Sambrook J ,Russell DW. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* , 3rd ed. Now York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,2002 .pp. 1256 - 1260.
- [ 14 ] Li HY(李海燕),Yu KZ(于康震),Xin XC(辛晓光),*et al.* Development and validation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay test kit for detecting anti-influenza virus antibodies. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*(中国预防兽医学报), 2000, **22** (3) :182 - 185.
- [ 15 ] Huo F(霍烽),Huo L(霍蕾). Quarantine methods of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*(内蒙古农业大学学报) 2006, **27** (1) :141 - 143.
- [ 16 ] Hartley CA ,Drummer HE ,Studdert MJ. The nucleotide sequence of the glycoprotein G homologue of equine herpesvirus 3 (EHV3) indicates EHV3 is a distinct equid alphaherpesvirus. *Arch Virol* , 1999, **144** (10) :2023 - 2033.
- [ 17 ] Hang WJ(黄伟坚),Jiang Y(姜焱),Chen DS(陈德胜). Cloning , sequence analysis of the gG gene of Pseudorabies virus SH strain. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 2003, **26** (1) :107 - 110.
- [ 18 ] Li ZL(李兆利),Xue F(薛飞),Zhu YM(朱远茂). The research advances of gB of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Progress in Veterinary Medicine*(动物医学进展) 2006, **27** (4) :1 - 4.