

# 狂犬病病毒 N 蛋白主要抗原区的表达及 SPA-ELISA 抗体检测方法的建立

曾妮<sup>1</sup>, 官苗苗<sup>1</sup>, 郭李平<sup>2</sup>, 邱文英<sup>1</sup>, 李刚<sup>1</sup>

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

2 中国农业大学动物医学院, 北京 100193

**摘要:** 为有效监测免疫狂犬病疫苗后的抗体水平, 以狂犬病病毒 N 蛋白的主要抗原表位所在区域 N1 蛋白为包被抗原, 建立了 SPA-ELISA 抗体检测方法。用 RT-PCR 方法分别扩增出狂犬病病毒 Flury LEP 株 N 基因及其 N1 区域 (1 000~1 353 bp), 将二者分别克隆至原核表达载体 pGEX-6P-1 中, 并将重组的表达载体分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 经 1 mmol/L IPTG 诱导后进行免疫印迹分析。结果表明, 重组的 RV N 和 RV N1 均以包涵体形式表达。与表达全长 RV N 相比, RV N1 的表达量显著高于前者, 且该重组蛋白同样具有良好的反应原性。用纯化的重组 RV N1 作为诊断抗原建立了检测犬 RV 抗体的间接 ELISA 方法。通过优化反应条件, 确定抗原最佳包被量是 2 mg/L, 血清的最佳稀释度为 1:100, Protein A-HRP 的稀释度为 1:4 000。用建立的 ELISA 方法对 102 份临床血清样品进行检测, 与商品化试剂盒相比, 二者的符合率为 94.1%。试验结果表明基于主要抗原表位所在区域 N1 蛋白的 SPA-ELISA 方法可有效用于犬 RV 抗体水平的检测, 为检测 RV 免疫抗体的 ELISA 试剂盒的研制奠定了基础。

**关键词:** 狂犬病病毒, 主要抗原区, Protein A, ELISA, 抗体检测

## Development of SPA-ELISA for detection of antibodies against rabies virus based on expression of main antigenic determinant of Nucleoprotein

Ni Zeng<sup>1</sup>, Miaomiao Gong<sup>1</sup>, Liping Guo<sup>2</sup>, Wenying Qiu<sup>1</sup>, and Gang Li<sup>1</sup>

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Veterinary Medicine, Chinese Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** To evaluate the effectiveness of rabies vaccination, we developed the SPA-ELISA method to detect the antibodies

**Received:** November 9, 2010; **Accepted:** May 19, 2011

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA10Z411), Beijing Science and Technology Project (No. Z07010501780701), National Public Welfare Project (Nos. 20083014, 200903037-2).

**Corresponding author:** Gang Li. Tel: +86-10-62813876; E-mail: gli358@gmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA10Z411), 北京市科委项目 (No. Z07010501780701), 国家公益行业项目 (Nos. 20083014, 200903037-2) 资助。

against rabies virus (RV) using the main antigenic determinant of nucleoprotein (RV N1) as antigen. The complete Nucleoprotein (N) gene and the partial N1 gene (1 000–1 353 bp) of RV Flury LEP strain were amplified using RT-PCR and PCR approaches. The two fragments were inserted into pGEX-6P-1 respectively. Then we transformed the recombinant plasmids into *Escherichia coli* BL21(DE3) strain and expressed them by adding 1 mmol/L of IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). SDS-PAGE analysis showed that both of the two recombinant proteins were presented as inclusion bodies. Compared with the complete nucleoprotein, the partial protein (RV N1) was expressed at a much higher level in *E. coli* BL21(DE3). The antigenic specificity of the partial N1 protein was confirmed by Western blotting. By coating the plates with purified RV N1 as an antigen, an SPA-ELISA method for the detection of the antibodies against RV was established. By optimizing this method, the optimal concentration of RV N1 coating the ELISA plate was 2 mg/L. The optimal concentration of serum samples and SPA-HRP was 1:100 and 1:4 000 respectively. Compared with a commercially available ELISA kit coating RV as antigen, the coincidence rate of SPA-ELISA was 94.1%. Our results show that the developed SPA-ELISA based on the RV N1 was useful for the detection of the antibodies against RV in the sera of dogs.

**Keywords:** rabies virus, main antigenic determinant, protein A, ELISA, antibody detection

狂犬病是由狂犬病病毒 (Rabies virus, RV) 引起的人兽共患疾病。人和所有温血动物易感。到目前为止, 还没有十分有效的方法能治疗狂犬病, 一旦发病, 死亡率几乎是 100%<sup>[1-2]</sup>。狂犬病已经成为严重危害公共卫生的重大疫病, 这使得人们对接种狂犬病疫苗的动物能否产生有效的免疫力尤为关注。因而需建立一种用于狂犬病病毒抗体检测方法, 以期评估现行接种犬狂犬疫苗的免疫接种效果, 消除免疫不确实动物对人传染的隐患。

世界动物卫生组织 (OIE) 推荐荧光抗体中和试验和快速荧光抑制试验检测狂犬病病毒抗体<sup>[3]</sup>, 但这两种方法均不适合大规模的狂犬病血清学检测。人们已开始建立以酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法为核心技术的狂犬病病毒抗体的检测方法<sup>[4-5]</sup>。ELISA 具有敏感、特异、简便、快速等优点, 已广泛用于多种疫病的实验室诊断和免疫监测。针对狂犬病病毒抗体, 建立敏感、快速的 ELISA 方法也成为狂犬病诊断方法研究的方向和热点。

N 蛋白是狂犬病病毒的主要结构蛋白, 占总蛋白的 36%, 是含有 450 个氨基酸残基的多肽链。RV N 蛋白至少存在 4 个抗原表位 (I-IV)<sup>[6-8]</sup>, 其中线性表位为 I、IV, 结构依赖性表位为 II、III。表位 I 和 IV 位于核蛋白的第 360~383 个氨基酸残基, 可激发体液免疫和细胞免疫<sup>[9-11]</sup>。本研究截取 N 蛋白主要的 2 个线性表位所在区域 N1 蛋白作为包被抗

原, 通过条件的优化, 建立了检测犬血清中 RV 免疫抗体的间接 ELISA 方法, 为检测 RV 免疫抗体的 ELISA 诊断试剂盒的研制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和血清样品

犬 RV 阳性血清由中国兽医药品监察所支海兵研究员惠赠; 犬 RV 阴性血清由本实验室制备; 狂犬病病毒 Flury LEP 株由中国兽医药品监察所王栋教授惠赠; 犬临床血清样品由北京市畜牧兽医总站及安徽某犬场提供; 犬瘟热病毒阳性血清、犬细小病毒阳性血清、犬传染性肝炎病毒阳性血清由本实验室保存。

### 1.2 菌种、载体及试剂

感受态细胞大肠杆菌 TOP 10 和大肠杆菌 BL21(DE3), pEASY-T1 克隆试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 原核表达载体 pGEX-6P-1 由本实验室保存; M-MuLV 反转录酶购自 Fermentas 公司; LA Taq 酶、EcoR I、Xho I、T4 DNA 连接酶等工具酶均购自大连宝生物工程有限公 司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质量小提试剂盒购自 Omega 公司; 辣根过氧化物酶标记的蛋白 A (Protein A-HRP) 购自北京热景生物有限公司; 动物狂犬病病毒 IgG 抗体测定试剂盒购自宁波天润生物药业有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 RV Flury LEP 毒株 N 蛋白基因的核苷酸序列 (GenBank Accession No. DQ099524.1) 第 334~451 位氨基酸基因编码序列 N1 和全长 N 蛋白基因序列, 分别设计引物, 由 Invitrogen 公司合成, 引物名称序列见表 1。

### 1.4 RV Flury LEP 株 N 蛋白基因的扩增、克隆及测序

以 Trizol 法提取 BHK-21 细胞培养的 RV Flury LEP 病毒液中的总 RNA, 用 M-MuLV 反转录酶 42 °C 作用 1 h 合成 cDNA, 以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后, 与 pEASY-T1 载体连接, 转化至 *E. coli* TOP 10 感受态细胞中, 37 °C 培养 14~16 h。提取质粒进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒送去上海生工工程技术服务有限公司测序。经测序鉴定正确的重组质粒命名为 pEASY-T1-N 和 pEASY-T1-N1。

### 1.5 重组表达质粒的构建与鉴定

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pEASY-T1-N、pEASY-T1-N1 和原核表达载体 pGEX-6P-1, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。将纯化后的 N1 和 N 基因酶切产物分别与 pGEX-6P-1 酶切产物按适量比例用 T4 DNA 连接酶连接, 将连接产物转化至 *E. coli* TOP 10 感受态细胞中, 37 °C 培养 14~16 h 后提取质粒, 经过双酶切鉴定和测序分析获得阳性表达载体质粒 pGEX-6P-1-RV-N 和 pGEX-6P-1-RV-N1。

### 1.6 重组蛋白的诱导表达及表达产物的鉴定

将测序正确的重组质粒转化至 *E. coli*

BL21(DE3), 挑取单菌落进行扩增, 当细胞培养至  $OD_{600}$  约为 0.6 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L, 于 37 °C 诱导表达 5 h; 同时, 设立含 pGEX-6P-1 空载体的表达菌作为对照, 分别取样进行 SDS-PAGE 分析。收集菌体, 超声波破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 分别取菌体总蛋白、上清、沉淀进行 SDS-PAGE, 分析蛋白表达形式, 同时设立含 pGEX-6P-1 空载体的表达菌作为对照。

将诱导表达菌和对照菌全菌体蛋白经 SDS-PAGE 分析后, 按常规方法进行电转印。转印结束后, 用狂犬病标准阳性血清和 HRP 标记的 Protein A 进行 Western blotting 检测, 验证蛋白的反应原性。

### 1.7 表达产物的纯化

取诱导表达菌 100 mL, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体; 用 10 mL 的 PBS 重悬菌体, 冰上超声破碎后, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min; 收集上清和沉淀, 用包涵体洗涤液 (20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% Tritonx-100, pH 8.3) 洗涤, 再用 2 mol/L 尿素洗涤 1 次; 加入 8 mol/L 尿素于 4 °C 溶解后, 12 000 r/min、4 °C 离心 30 min; 分别用含有 4、2、0 mol/L 尿素的复性液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% Glycine) 透析复性。

### 1.8 间接 SPA-ELISA 方法的建立

#### 1.8.1 抗原包被浓度及血清稀释度的确定

将纯化的 RV N1 蛋白作为诊断抗原, 用包被液 (0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 将诊断抗原稀释成 6、4、2、1、0.5、0.25 mg/L, 每孔加入 100  $\mu$ L,

表 1 用于构建原核表达质粒的扩增引物

Table 1 Amplification primers for construction of expression vectors

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
RV-NF	GCAG <u>AATT</u> TCATGGATGCCGACAAGATTGTG	1353
RV-NR	GCG <u>CTCGAG</u> TTATGAGTCACTCGAATACG	
RV-N1F	CGAG <u>AATT</u> CTGTGCCCTCATGAGATGTC	353
RV-N1R	GCG <u>CTCGAG</u> TTATGAGTCACTCGAATACG	

The restriction enzyme sites are shown by the underlines in the primers sequences.

4 °C 包被过夜。RV 阳性血清和阴性血清用 PBST (含有 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS, pH 7.4) 稀释成 1:100、1:200、1:300, 每孔加入 100  $\mu$ L, 组成方阵, 按照常规方法进行实验。

### 1.8.2 封闭试剂的选择

在确定最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的基础上, 分别选用 10% 牛血清、1% BSA、5% 脱脂奶粉、1% 明胶作为封闭试剂, 每孔加入 200  $\mu$ L, 37 °C 封闭 2 h。每份血清重复 2 孔, 测定  $OD_{450}$  值, 并分析 P/N 值变化情况。

### 1.8.3 血清孵育时间的确定

在确定封闭剂后, 每孔加入 100  $\mu$ L 最佳稀释度的血清, 37 °C 分别孵育 30、60、90、120 min, 在相同条件下进行 ELISA 检测, 取 P/N 值最大且接近于 1.0 的血清孵育时间为最佳血清孵育时间。

### 1.8.4 辣根过氧化物酶标记的蛋白 A (Protein A-HRP) 工作浓度的优化

将 Protein A-HRP 稀释成 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 后, 每孔加 100  $\mu$ L, 其他条件为上述所优化好的最佳条件, 根据 P/N 值确定 Protein A-HRP 最佳工作浓度。

### 1.8.5 Protein A-HRP 作用时间的确定

在优化 Protein A-HRP 工作浓度后, 于 37 °C 下分别作用 30、60、90、120 min, 用 RV 阳性血清、阴性血清进行 ELISA 检测, 测定  $OD_{450}$  值, 并分析 P/N 值变化情况。

### 1.8.6 显色时间的确定

每孔中加入 100  $\mu$ L TMB 单组分显色液, 在 37 °C 黑暗条件下分别显色 5、10、15、20 min, 其他条件为上述所优化好的最佳条件, 根据 P/N 值和  $OD_{450}$  值确定最佳显色时间。

## 1.9 重复性实验

### 1.9.1 批内重复性实验

用同一批制备的重组抗原包被的酶标板, 随机取 3 份血清, 每份血清做 6 孔重复, 在同一条件下

按照间接 ELISA 的程序进行检测, 结果进行统计学分析。

### 1.9.2 批间重复性实验

用 4 次制备的重组抗原包被的酶标板, 随机取 1 份血清, 按照间接 ELISA 的程序进行检测, 结果进行统计学分析。

### 1.9.3 cut off 值及阴阳性标准的确定

将 30 份犬狂犬病病毒阴性血清按照已建立的 SPA-ELISA 方法进行检测, 计算出阴性  $OD_{450}$  值的算术平均值 ( $\bar{x}$ ) 和标准差 ( $s$ ), 从而确定 cut off 上限值 ( $\bar{x}+3s$ ) 和 cut off 下限值 ( $\bar{x}+2s$ )<sup>[12]</sup>。

### 1.9.4 特异性试验

以犬 RV 阴性血清和阳性血清为对照, 用已建立的 SPA-ELISA 检测未免疫狂犬病疫苗的犬细小病毒、犬瘟热病毒、犬传染性肝炎病毒的阳性血清, 分析所建立的 SPA-ELISA 方法的特异性。

### 1.9.5 临床样品的检测

用所建立的间接 ELISA 方法与商品化的动物狂犬病病毒 IgG 抗体测定试剂盒对从北京畜牧总站收集的 90 份犬血清和安徽某犬场收集的 12 份犬血清进行检测, 比较 2 次检测结果, 以验证该方法的可靠性。

## 2 结果

### 2.1 RV N 蛋白编码基因的扩增、克隆及测序

经过 RT-PCR 扩增获得 RV N 和 N1 基因片段, 琼脂糖凝胶电泳显示该片段大小分别在 1 353 bp 和 353 bp 左右, 与理论值相符, 同时对照组没有扩增出条带 (图 1)。

### 2.2 重组表达质粒的鉴定

重组的表达质粒 pGEX-6P-1-RV-N 和 pGEX-6P-1-RV-N1 都分别含有一个 *EcoR* I 和一个 *Xho* I 酶切位点, 因此用双酶切鉴定, 双酶切结果表示 RV N 和 N1 基因片段都已插入 pGEX-6P-1 载体, 与预期相符 (图 2、3)。

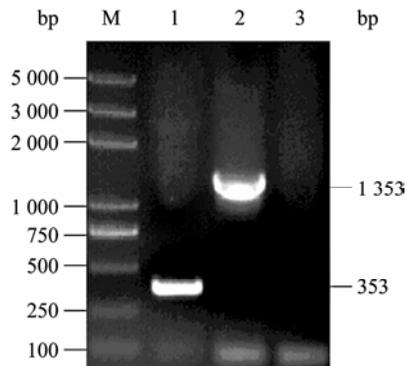


图 1 目的片段的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of target fragments by RT-PCR. M: DNA marker DL2000 plus; 1: RT-PCR product of RV N1; 2: RT-PCR product of RV N; 3: negative control.

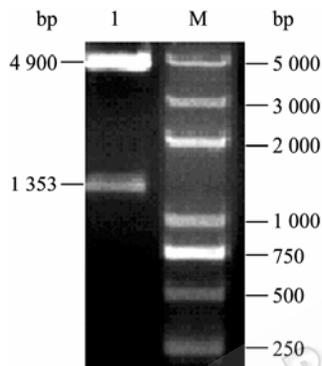


图 2 pGEX-6P-1-RV-N 重组载体双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant pGEX-6P-1-RV-N by enzyme digestion. M: DNA marker DL2000 plus; 1: pGEX-6P-1-RV-N digested with *EcoR* I and *Xho* I.

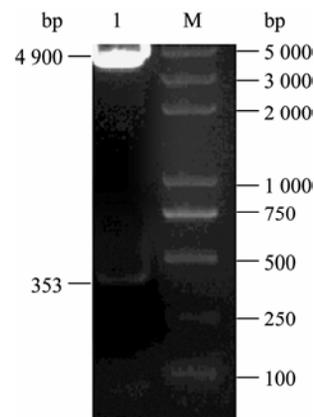


图 3 pGEX-6P-1-RV-N1 重组载体双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pGEX-6P-1-RV-N1 by enzyme digestion. M: DNA marker DL2000 plus; 1: pGEX-6P-1-RV-N1 digested with *EcoR* I and *Xho* I.

### 2.3 转化菌的诱导与表达产物的鉴定

经 1 mmol/L IPTG 诱导后, 含有重组表达质粒的大肠杆菌的表达产物经 SDS-PAGE 分析可见重组的 RV N1 蛋白大小约为 40 kDa, 其表达量显著高于 RV N 蛋白 (76 kDa 左右) (图 4), 且 RV N1 和 N 蛋白都以包涵体表达形式表达 (图 5)。同时, 诱导表达的 RV N1 蛋白经 Western blotting 显示, 目的条带明显、清晰, 说明重组 N1 蛋白具有良好的反应原性 (图 6), 可以用作诊断抗原。

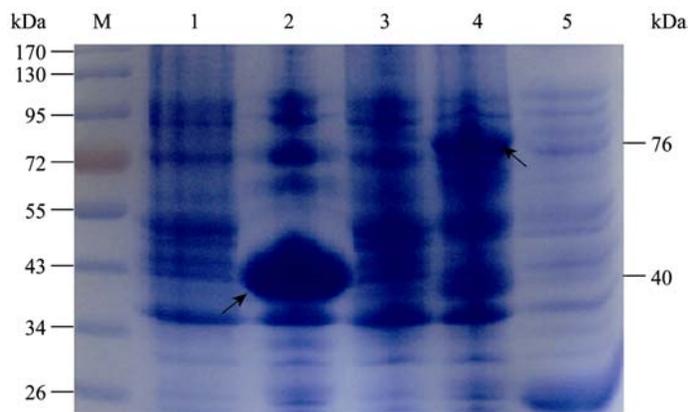


图 4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. M: protein marker; 1: pGEX-6P-1-RV-N1/BL21 before induced; 2: pGEX-6P-1-RV-N1/BL21 induced by IPTG; 3: pGEX-6P-1-RV-N/BL21 before induced; 4: pGEX-6P-1-RV-N/BL21 induced by IPTG; 5: pGEX-6P-1-RV/BL21 induced by IPTG.

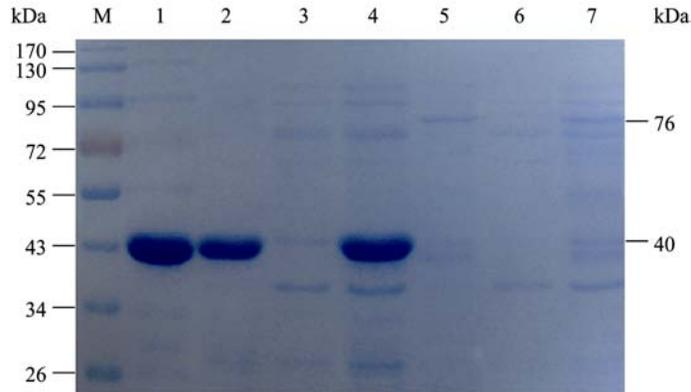


图5 重组蛋白表达形式的分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the existence of the recombination protein N1 and N. 1: purified N1 protein from recombinant bacteria lysate; 2: inclusion bodies of the recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N1; 3: supernatant of recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N1; 4: total recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N1; 5: inclusion bodies of the recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N; 6: supernatant of recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N; 7: total recombinant bacterial (BL21) of pGEX-6P-1-RV-N.

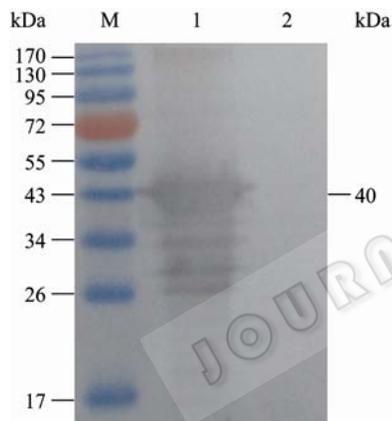


图6 RV N1 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis of the purified recombinant nucleoprotein. 1: pGEX-6P-1-RV-N1/BL21 induced by IPTG; 2: pGEX-6P-1/BL21 induced by IPTG; M: protein marker.

## 2.4 间接 ELISA 方法的建立

### 2.4.1 最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的确定

通过方阵法确定了最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度,具体结果见表 2。由表 2 的数据分析,抗原的最佳包被浓度为 2 mg/L,血清的最佳稀释度为 1:100,此时的  $OD_{450}$  接近 1.0,并且 P/N 值最大。

### 2.4.2 封闭试剂的选择

10%牛血清、5%脱脂奶粉、1% BSA、1%明胶作为封闭试剂时的检测结果见表 3,由表中的数

据可以看出用 10%牛血清作为封闭试剂时 P/N 值最大,  $OD_{450}$  在 1.0 左右。

### 2.4.3 血清孵育时间的确定

血清分别作用 30、60、90、120 min 的结果见表 4,由表中数据可以看出,随着血清孵育时间的延长  $OD_{450}$  值会有不同程度的升高,但作用时间增加后,非特异性吸附就会增加, P/N 值反而会降低,因此血清的最佳作用时间为 60 min。

### 2.4.4 Protein A-HRP 工作浓度的优化

通过对实验结果的分析, Protein A-HRP 的工作浓度为 1:4 000 时,  $OD_{450}$  接近 1.0,并且 P/N 值最大,故 Protein A-HRP 工作浓度确定为 1:4 000 (表 5)。

### 2.4.5 Protein A-HRP 作用时间的确定

表 6 表明,  $OD_{450}$  值不随着 Protein A-HRP 作用时间的延长而显著增大,同时 Protein A-HRP 作用 30 min 时  $OD_{450}$  已在 1.0 附近,故 Protein A-HRP 作用时间确定为 30 min。

### 2.4.6 最佳显色时间的确定

由表 7 可见, TMB 最佳作用时间确定为在 37 °C 避光条件下作用 15 min,然后用 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应。

表 2 方阵法确定最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的检测结果

Table 2 Optimization for concentration of antigen and dilution of serum with indirect ELISA

Serum dilution	Antigen coating concentration (mg/L)					
	6.00	4.00	2.00	1.00	0.50	0.25
P(1:100)	1.288	1.013	0.990	0.920	0.846	0.721
N(1:100)	0.078	0.084	0.043	0.060	0.025	0.059
P/N	16.513	12.059	23.023	15.333	33.840	12.220
P(1:200)	1.057	0.832	0.628	0.537	0.639	0.401
N(1:200)	0.094	0.035	0.041	0.028	0.033	0.020
P/N	11.245	23.771	15.317	19.179	19.364	20.050
P(1:300)	0.471	0.474	0.441	0.413	0.412	0.374
N(1:300)	0.038	0.022	0.021	0.025	0.013	0.020
P/N	12.395	21.545	21.000	16.520	31.692	18.700

表 3 采用不同封闭试剂的检测结果

Table 3 Optimization of blocking solutions

OD <sub>450</sub>	Blocking solutions			
	10% bovine serum	1% bovine serum albumin	5% skim milk powder	1% gelatin
P	1.103	1.467	1.210	1.358
N	0.042	0.122	0.075	0.083
P/N	26.261	12.024	16.133	16.361

表 4 血清最佳作用时间的优化

Table 4 Determination of optimal incubation of serum

OD <sub>450</sub>	Serum incubation time			
	30 min	60 min	90 min	120 min
P	0.823	1.111	1.255	1.293
N	0.073	0.071	0.085	0.099
P/N	11.341	15.546	14.786	13.075

表 5 酶标抗体最佳工作浓度的确定

Table 5 Determination of optimal dilutions of enzyme labeled antibody

OD <sub>450</sub>	Optimal dilutions of enzyme labeled antibody			
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
P	1.327	1.209	1.058	0.902
N	0.074	0.074	0.072	0.069
P/N	17.924	16.333	14.605	12.937

表 6 Protein A-HRP 最佳作用时间的确定

Table 6 Determination of optimal incubation time of Protein A-HRP

OD <sub>450</sub>	Enzyme labeled antibody incubation time			
	30 min	60 min	90 min	120 min
P	1.127	1.187	1.196	1.203
N	0.074	0.076	0.085	0.081
P/N	15.230	15.618	14.070	14.852

### 2.4.7 批内、批间重复性的评价

批内重复性实验结果见表 8。分别计算 3 份阳性血清 6 个重复孔  $OD_{450}$  值的平均值、标准差和变异系数。结果显示变异系数在 2.61%~5.51%之间, 低于 10%, 表明同一批抗原具有良好的稳定性, ELISA 试验批内重复性良好。

批间重复性检测结果见表 9。取用 6 次制备的重组抗原包被的酶标板, 随机取 1 份血清, 再按照间接 ELISA 的程序进行检测, 测得血清  $OD_{450}$  值的平均值、标准差和变异系数, 结果显示批间试验的变异系数为 2.79%, 小于 10%, 表明间接 ELISA 的批间重复性良好。

### 2.4.8 cut off 值及阴阳性标准的确定

将由本实验室制备的经荧光灶抑制试验确定为狂犬病病毒阴性血清的 30 份犬血清样品按照以建立的 SPA-ELISA 方法进行检测, 计算出阴性  $OD_{450}$   $\bar{x}=0.207$ ,  $s=0.065$ , 置信区间为 0.402~0.337。由此

根据间接 ELISA 判定标准,  $OD_{450}$  值  $\geq 0.402$  时判断为阳性样本,  $OD_{450}$  值  $\leq 0.337$  时判断为阴性样本, 介于二者之间判定为可疑样本, 进行重新检测, 若仍小于 0.402 则判定为阴性。

### 2.4.9 特异性试验

SPA-ELISA 检测结果显示, 犬细小病毒阳性血清、犬瘟热阳性血清的阳性血清、犬传染性肝炎病毒阳性血清检测均为阴性, 表明该方法具有良好的特异性。

### 2.4.10 临床样品的检测

对 102 份血清样品用所建立的间接 ELISA 方法进行检测, 检测结果显示其中有 84 份为阳性, 12 份为阴性, 6 份为疑似阴性血清; 而用商品化的试剂盒检测出 90 份为阳性, 12 份为阴性, 故两者的符合率达 94.1%。用荧光灶抑制试验验证 6 份疑似阴性血清, 结果为阳性。

表 7 底物最佳显色时间的确定

Table 7 Determination of reaction time of substrate

$OD_{450}$	TMB incubation time			
	5 min	10 min	15 min	20 min
P	0.673	0.876	1.029	1.143
N	0.077	0.084	0.079	0.077
P/N	8.690	10.389	12.875	14.689

表 8 批内重复性实验结果

Table 8 Results of intro-batch duplicability test

Sample No.	Repeat detections						$\bar{x}$	$s$	CV value (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	1.443	1.485	1.409	1.423	1.368	1.394	1.420	0.037	2.61
2	1.347	1.363	1.325	1.411	1.386	1.405	1.373	0.076	5.51
3	0.813	0.910	0.942	0.836	0.904	0.871	0.879	0.044	5.05

表 9 批间重复性实验结果

Table 9 Results of inter-batch duplicability test

Sample No.	Repeat detections						$\bar{x}$	$s$	CV value (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	1.288	1.3644	1.375	1.412	1.387	1.366	1.365	0.038	2.79

### 3 讨论

狂犬病是一种危害严重的人兽共患疾病。犬、猫是狂犬病的主要传染源。因此不仅犬只的免疫是防止狂犬病传播的一项重要工作,而且犬只免疫后抗体水平的监测是保证免疫有效的关键。本研究同时构建了含有全长的 RV N 基因的原核表达质粒和含有 RV N 基因的主要抗原区(编码第 334~453 位氨基酸的基因序列)的原核表达质粒。经 IPTG 诱导,截短的 RV N1 主要以包涵体的形式高效表达。RV N 全长蛋白虽也能表达,但其表达量远低于 RV N1,且属于包涵体表达,这对蛋白的纯化带来了极大的不便。而对于高效表达的 RV N1,用含 2 mol/L 尿素的包涵体洗涤液洗涤包涵体后,可得到纯度达 90% 的重组蛋白,用复性液透析后均能保持良好的反应性,其纯化方式简单、快速。此外, RV N1 含有的 2 个主要线性表位,经 Western blotting 证明,该重组蛋白具有较强的反应原性,因此可以用作狂犬病抗体检测的诊断抗原。

Protein A 具有和人及多种动物如猪、兔、犬、小鼠、豚鼠的 IgG Fc 段结合的能力,由于其具有不受动物种类限制的特点,可作为一种广谱的二抗,在免疫诊断中的广泛应用。本研究中用 Protein A-HRP 代替抗犬的酶标二抗,对 102 份犬血清样品进行检测,其结果和商品化的 ELISA 试剂盒检测结果相比,二者有较高的符合率,因此该方法可以用于犬血清中 RV 免疫抗体的检测;同时,由于 Protein A 的特点,有希望建立一种检测犬、猫及人血清中的 RV 抗体的一种通用的方法,具有较大的应用价值,但后期工作还需进一步收集更多数量的血清对该方法进行验证和完善。

### REFERENCES

- [1] Warrell MJ. Emerging aspects of rabies infection: with a special emphasis on children. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(3): 251-257.
- [2] Nigg AJ, Walker PL. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Pharmaco*, 2009, 29(10): 1182-1195.
- [3] Office International des Epizooties, Rabies//OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris: OIE, 2008: 304-323.
- [4] Servat A, Cliquet F. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Res*, 2006, 120(1/2): 17-27.
- [5] Cliquet F, McElhinney LM, Servat A, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J Virol Meth*, 2004, 117(1): 1-8.
- [6] Minamoto N, Tanaka H, Hishida M, et al. Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol Immunol*, 1994, 38(6): 449-455.
- [7] Goto H, Minamoto N, Ito H, et al. Expression of the nucleoprotein of rabies virus in *Escherichia coli* and mapping of antigenic sites. *Arch Virol*, 1995, 140(6): 1061-1074.
- [8] Goto H, Minamoto N, Ito H, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol*, 2000, 81(1): 119-127.
- [9] Fu ZF, Wunner WH, Dietzschold B. Immunoprotection by rabies virus nucleoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994, 187: 161-172.
- [10] Ertl HC, Dietzschold B, Gore M, et al. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J Gen Virol*, 1989, 63(7): 2885-2892.
- [11] Sumner JW, Fekadu M, Shaddock JH, et al. Protection of mice with vaccinia virus recombinants that express the rabies nucleoprotein. *Virology*, 1991, 183(2): 703-710.
- [12] Huang HL, Zhou R, Chen ML, et al. Cloning and expression of the *ApxIVA* gene of *Actionbacillus pleuroneumoniae* and development of an indirect ApxIVA-ELISA. *Chin J Biotech*, 2005, 21(2): 294-299. 黄红亮, 周锐, 陈美玲, 等. 胸膜肺炎放线杆菌毒素 *apxIVA* 基因的克隆与表达及间接 ELISA 方法的建立. *生物工程学报*, 2005, 21(2): 294-299.