

## 检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的重组 N 蛋白—乳胶凝集试验的建立\*

许立华<sup>1,2</sup>, 苏鑫铭<sup>1</sup>, 刘华雷<sup>1</sup>, 任雪枫<sup>1</sup>, 王志亮<sup>3</sup>, 吴延功<sup>3</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>(1. 南京农业大学农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 宁夏大学农学院动物科学系, 宁夏银川 750021;  
3. 农业部动物检疫所, 山东青岛 266032)**Establishment of Recombinant N Protein Based Latex Agglutination Test for  
Detection of Antibody Against Porcine Reproductive and  
Respiratory Syndrome Virus**XU Li-hua<sup>1, 2</sup>, SU Xin-ming<sup>1</sup>, LIU Hua-lei<sup>1</sup>, REN Xue-feng<sup>1</sup>, WANG Zhi-liang<sup>3</sup>,  
WU Yan-gong<sup>3</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*\*</sup>(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095,  
China; 2. Department of Animal Science, Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3 Animal  
Quarantine Institute of Agriculture Ministry, QingDao 266032, China)**Abstract:** The purified recombinant nucleocapsid protein of PRRSV was used to conjoined with latex, and the conjoined concentration, temperature and time were optimized, a detection method for serum antibodies against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus was established. Some tests for the method's sensitivity, specificity and stability were confirmed. About 200 serum samples were detected by using the method, and these samples were also detected by recombinant N protein based ELISA and IDEXX ELISA kit. The result showed that the agreement ratio of the recombinant N protein based LAT with other two methods arrived at 93%, 78%, respectively.**Key words:** Recombinant N protein; Antibodies of porcine reproductive and respiratory syndrome; Serum antibody; Latex agglutination test**关键词:** 重组 N 蛋白; 猪繁殖与呼吸综合征抗体; 血清抗体; 乳胶凝集试验

中图分类号: 5852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0401-03

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)于1987年首先在美国被发现,现在已经成为危害世界养猪业发展的重要传染病之一。我国已在许多地区分离到该病的病原体—猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV),从而证实了该病在我国的流行<sup>[1-4]</sup>。这些年来,本病的临床表现及流行病学也出现了新的变化,如隐性感染及慢性感染病例显著上升,持续性感染在猪群中较

为普遍。由于本病同其它引起猪繁殖障碍的疾病(如猪细小病毒病、伪狂犬病等)表现出极为相似临床症状,并伴随混合感染和继发感染<sup>[5]</sup>,增加了临床诊断的难度。所以,探索一种简便易行具有推广意义的检测方法成为本研究的方向。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

表达猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)核衣

收稿日期: 2004-01-02 修回日期: 2004-02-18

\* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划资助项目(2001AA249012)。

作者简介: 许立华(1972-),男,宁夏永宁籍,硕士,讲师,主要从事动物分子病毒学及疫病诊断方法与防治技术的研究。

\*\* 通讯作者: 陈溥言(1941-),男,江苏南京籍,教授,博士生导师,主要从事动物分子病毒学与免疫学的研究。Tel: 025-4396028.

E-mail: aid@njau.edu.cn 或 lihuaxu1972@sohu.com

壳蛋白基因的重组载体 pETN 为笔者所构建<sup>[6]</sup>；BL21 (DE3) 宿主菌为本室保存；医用乳胶购自上海市临检中心；蛋白质纯化试剂盒为 Novagen 公司出品；IDEXX 公司 PRRS ELISA 诊断试剂盒购自上海罗曼生物技术公司；PRRS 阴性、阳性血清为本室保存；PRRS 兔抗血清为本室制备并保存；对照用猪繁殖障碍性疾病阳性血清均为本室保存；检测用血清样品从江苏、浙江、山东、安徽等地采集或收集。

### 1.2 PRRSV N 蛋白的获得与纯化

按常规方法将笔者已构建的重组质粒 pETN 转化到 BL21 (DE3) 宿主菌<sup>[7]</sup>，并对转化物进行诱导表达<sup>[6]</sup>。将表达产物分别经离心、洗涤后经超声波裂解，随后用裂解液重悬，后离心取上清，将此上清用蛋白质纯化试剂盒进行纯化。随后通过 SDS—PAGE 电泳判定纯化效果，并经 Western-blot 试验检验纯化产物的特异性。

### 1.3 重组 N 蛋白致敏乳胶凝集试验操作程序

乳胶的预处理及重组 N 蛋白致敏乳胶最佳条件的确定参照有关方法<sup>[8-9]</sup>。定性试验的操作程序与结果判定同常规方法。

### 1.4 重组 N 蛋白致敏乳胶的稳定性检验

将重组 N 蛋白致敏乳胶分别于室温及 4℃ 保存，肉眼观察乳胶有无发生自身凝集，并于显微镜下观察乳胶颗粒的形状。将致敏乳胶在适宜的保存温度下分别放置一定时间（2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周），取出后观察乳胶状态，并用已知阴、阳性血清进行检测。

### 1.5 特异性试验

采用实验室保存的 PRRS 阴、阳性血清、PRRS 兔抗血清、猪细小病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪乙型脑炎病毒阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪布鲁氏菌病阳性血清，按凝集试验的操作方法进行检验，同时设立 pH7.2 PBS 的对照，结果判定同前。

### 1.6 敏感性试验

取 50 份已知背景并经 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒检测的血清样品，采用本方法检测，统计结果并评价其敏感性。

### 1.7 重复性试验

分别对已知的阴、阳性血清、及五份待检血清应用本方法进行检测，每份样品重复五次。取不同时间（三批）制备并纯化的重组 N 蛋白，按照前面述及的方法处理并致敏乳胶，经稳定性检测合格后检测包括阴、阳性血清在内的七份血清，每 2 周重复一次，共进行长达三个月的重复试验。

### 1.8 重组 N 蛋白-乳胶凝集试验的检测应用

取本实验室采集的 200 份待检血清样品，分别用 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒、重组 N 蛋白—ELISA 检测方法及重组 N 蛋白—乳胶凝集试验进行检测，并对结果进行分析比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组 N 蛋白的特异性检查

Western-blot 试验结果显示，在目标条带所在位置出现一条明显的棕褐色印迹，未见到杂条带。证明该纯化产物具有良好的特异性。

### 2.2 重组 N 蛋白致敏乳胶最佳条件的确定

通过试验，确定重组 N 蛋白最佳致敏浓度为 29.2 μg/mL，最佳致敏温度为 45℃，最佳致敏时间确定为 120min。

### 2.3 重组 N 蛋白致敏乳胶的稳定性检验

经 3 个月的观察与检测，确定致敏乳胶需置于 4℃ 保存，保存期最长可达 10 周。

### 2.4 特异性与敏感性检测

通过乳胶凝集试验，PRRS 阳性血清、PRRS 兔抗血清发生完全凝集，猪细小病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪乙型脑炎病毒阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪布鲁氏菌病阳性血清及 PRRS 阴性血清、PBS 均不发生凝集反应，此结果证实了这种方法的良好特异性；以 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒作为参照，以两种方法检测后均为阳性或阴性结果且与血清背景相符的结果为重要依据，确定本研究建立的重组 N 蛋白-乳胶凝集试验的检测敏感性为 78%。

### 2.5 重复性试验

批内重复试验结果见表 1。可以看出，阴、阳性血清、PRRS 兔抗血清及样品 3 前后五次检测结果一致，而样品 1、2 在总体结果一致的情况下，稍有波动，但不会对最终结果判定产生影响。

取不同阶段制备的重组 N 蛋白，分别致敏乳胶后进行应用，检测包括阴、阳性血清在内的七份血

表 1 重组 N 蛋白—乳胶凝集试验的批内重复试验

Detect- ed serum of	Positive Serum of PRRS	Negative Serum of PRRS	Anti-rabbit serum of PRRS	sample 1	sample 2	sample 3
Results	++++	—	++++	++++	++++	—
of	++++	—	++++	+++	++++	—
detecti- on	++++	—	++++	+++	+++	—
	++++	—	++++	++++	+++	—

— Nonagglutinate; + 25% agglutinate; ++ 50% agglutinate; +++ 75% agglutinate; ++++ 100% agglutinate

清。检测结果表明前后几批抗原致敏乳胶后, 其检测效果稳定, 有良好的重复性。

## 2.6 重组 N 蛋白—乳胶凝集试验的应用

三种方法的检测结果见表 2。由表 2 可以得出, 重组 N 蛋白—乳胶凝集试验 (rN-LAT) 的阳性检出率为 42.5%、阴性检出率为 57.5%。rN-LAT 与 IDEXX 公司 ELISA 试剂盒符合率为 78%, 与重组 N 蛋白—ELISA (rN-ELISA) 的符合率为 93%。由此说明本方法在检测结果上与前者尚有一定差距, 在试验的特异性上差别不大, 但在敏感性方面需作出调整。

表 2 重组 N 蛋白—乳胶凝集试验的应用

Table 2 Application of recombinant N protein based LAT

Detection methods	Amount of positive samples	Ratio of detection (%)	Amount of negative samples	Ratio of detection (%)
ELISA kit of IDXX	76	38%	124	62%
Recombinant N protein based ELISA	82	41%	118	59%
Recombinant N protein based LAT	85	42.5%	115	57.5%

本研究用纯化的 PRRSV 重组 N 蛋白作为抗原致敏乳胶, 初步建立了检测 PRRS 抗体的乳胶凝集试验 (LAT)。应用该方法与 IDEXX 公司的 ELISA 试剂盒同步检测了 200 份待检血清, 两者的符合率达 78%。检测结果显示, 这两种方法在少量血清的

检测上存在差异, 笔者认为同所用抗原的性质及血清抗体的类型有关。随着对该方法的进一步完善, 将其用于大规模检测是我们努力实现的目标之一。

## 参考文献

- [1] 陈博文, 孙颖杰, 罗长保, 等. 猪繁殖与呼吸系统综合征的血清学检测及病毒的分离和鉴定 (初报) [J]. 中国兽医杂志, 1996, 22 (5): 6-8.
- [2] 姜平, 简中友, 马志勇, 等. 中国某地区猪繁殖与呼吸综合征流行病学调查及病毒分离 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19 (8): 118.
- [3] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23, (10): 9-10.
- [4] 刘文兴, 蔡雪晖, 郭宝清, 等. 猪生殖-呼吸道综合征病毒 (PRRSV) 分离鉴定及其与欧、美 PRRSV 抗原的比较 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20 (4): 193-195.
- [5] 芦银华, 许立华, 华修国, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒及圆环病毒的分子生物学快速检测 [J]. 中国病毒学, 2003, 18 (2): 184-186.
- [6] 许立华, 芦银华, 胡志华, 等. 猪繁殖与呼吸综合征 N 基因的克隆与高效表达载体的构建 [J]. 中国病毒学, 2003, 18 (3): 279-282.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 880-888.
- [8] 杜念兴. 兽医免疫学 [M]. 北京, 农业出版社, 1996, 230-243.
- [9] 王重庆. 分子免疫学基础 [M]. 北京, 北京大学出版社, 1998, 186-253.