

# 猪瘟疫病毒 NS3 基因克隆、原核表达及 间接 ELISA 方法初步建立

蒋大良<sup>1</sup> 余兴龙<sup>1\*</sup> 李润成<sup>1</sup> 葛猛<sup>1</sup> 罗维<sup>1</sup> 颜爱<sup>1</sup> 李杰<sup>1</sup> 刘春红<sup>1</sup> 涂长春<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学 动物医学院 湖南 长沙 410128)

(2. 军事医学科学院 军事兽医研究所 吉林 长春 130062)

**摘要:** 采用 PCR 方法从携带猪瘟疫病毒兔化弱毒(Hog cholera lapinized virus, HCLV)全长基因组 cDNA 的质粒 pPOHCLV 中扩增到长度为 2000 bp 左右 NS3 基因序列, 并将其克隆至原核表达载体 pET-32a(+), 构建成重组原核表达载体 pETNS3。将 pETNS3 在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行优化表达, SDS-PAGE 分析重组蛋白 NS3 主要以包涵体形式表达, 分子大小约 95 kD。Western Blotting 分析表明重组蛋白 NS3 具有免疫原性。采用 Ni<sup>2+</sup>亲和和层析方法纯化得到重组蛋白 NS3 (90%)。以纯化的重组蛋白 NS3 为抗原初步建立了检测 CSFV NS3 抗体的间接 ELISA 方法, 检测 221 份不同猪群和年龄猪的血清样品。检测结果与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果进行对比, 阳性符合率为 83.33%, 阴性符合率为 89.38%, 总符合率为 86.43%。30 份存在差异的血清样品用间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescence assay, IFA)进行检测, 结果显示 IFA 检测结果与 NS3 间接 ELISA 和 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒符合率分别为 56.67%和 43.33%。

**关键词:** CSFV, NS3, 基因克隆, 原核表达, 蛋白纯化, 免疫印迹, 间接 ELISA, IFA

## Cloning, Prokaryotic Expression of CSFV NS3 Gene, and Preliminary Establishment of an Indirect ELISA for Serum Antibody Detection

JIANG Da-Liang<sup>1</sup> YU Xing-Long<sup>1\*</sup> LI Run-Cheng<sup>1</sup> GE Meng<sup>1</sup>  
LUO Wei<sup>1</sup> YAN Ai<sup>1</sup> LI Jie<sup>1</sup> LIU Chun-Hong<sup>1</sup> TU Chang-Chun<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. Institute of Military Veterinary Research, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, Jilin 130062, China)

**Abstract:** NS3 gene fragment (about 2000 bp) was amplified by PCR from plasmid of pPOHCLV containing Hog Cholera Lapinized Virus (HCLV) cDNA, and cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a (+) to obtain the recombinant prokaryotic expression vector pETNS3. The pETNS3 was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) and expressed optimally. The recombinant protein NS3 about 95 kD was detected by SDS-PAGE and expressed mainly in the form of inclusion bodies. The result of Western blotting showed re-

combinant protein NS3 has immunogenicity. The nickel affinity chromatography was employed to purify the target protein, and purified recombinant protein NS3 (90%) was obtained. An indirect ELISA was initially established to detect antibody against CSFV NS3 protein, and 221 sera samples of pig from different herds and ages were tested. The result was compared with CSFV-Ab test kit of IDEXX, and the result showed: the positive coincidence rate was 83.33%, the negative coincidence rate 89.38%, and the total coincidence rate 86.34%. 30 serum samples showed inconsistent, and were detected by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). The results showed: compared with IFA the accuracy rate of result detected by NS3 indirect ELISA and CSFV-Ab test kit of IDEXX was 56.67% and 43.33% respectively.

**Keywords:** CSFV, NS3, Gene clone, Prokaryotic expression, Western blotting, Indirect ELISA, IFA

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由 CSFV 引起的一种急性热性传染病, 各种年龄阶段的猪均可感染发病, 该病被国际动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病, 我国将其列为甲类传染病。该病在北美洲、大洋洲及部分欧洲国家已经消灭, 但在其他养猪国家仍广泛存在, 并对养猪业造成严重危害。我国长期对猪群免疫接种猪瘟病毒兔化弱毒疫苗, 基本控制了猪瘟的大流行, 但猪瘟在我国各地猪群中广泛存在, 并呈现地区性散发性特点, 猪群中存在一定隐性感染和持续性感染现象<sup>[1]</sup>。

CSFV 属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)成员, CSFV 全基因组大小约 12.3 kb, 从 N 端开始至 C 端各个蛋白依次为 Npro、C、E0 (E<sup>ms</sup>)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B<sup>[2-3]</sup>。CSFV 非结构蛋白 NS3 蛋白是该病毒最保守的蛋白之一, 具有丝氨酸蛋白酶、核苷三磷酸酶和 RNA 解旋酶活性, 是病毒复制增殖必需蛋白<sup>[4-5]</sup>。研究表明 NS3 是瘟病毒引起细胞病变作用主要因子, 其在动物体内具有很好的免疫原性, 感染后体内能产生不同程度的抗体<sup>[6-7]</sup>。NS3 和 E0、E2 一样是 CSFV 主要抗原蛋白, 所以检测猪体内 NS3 抗体水平可以反映 CSFV 在体内感染状况, 以 NS3 蛋白为抗原建立 ELISA 可以作为 CSF 的一种血清学检测方法。

本实验将猪瘟病毒兔化弱毒 NS3 基因克隆到原核表达载体 pET-32a (+)中构建重组质粒 pETNS3, 在大肠杆菌 Rosetta (DE3)菌中进行优化表达, 表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。纯化回收后重组蛋白 NS3 作为包被抗原, 初步建立起间接 ELISA, 将检测结果与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒和 IFA 检测结果进行对比。该试验为开发出新的 CSF 血清学 ELISA 检测方法具有重要意义, 同时能为 CSFV E2 基因工程疫苗免

疫猪群抗体检测提供鉴别 ELISA, 对我国开展 CSF 净化工作意义重大。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 CSFV cDNA、质粒、菌株、标准阴阳性血清、CSFV 病毒株和细胞:** 携带 HCLV cDNA 的 pPOHCLV 质粒<sup>[8]</sup>和 pET-32a (+)原核表达载体由本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 Rosetta (DE3)菌株感受态细胞由本实验室制备保存。

参考阳性血清为 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测为阳性, 阻断率为 91%; 参考阴性血清为 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测为阴性, 阻断率为 0。

CSFV 毒株为石门强毒株; 培养细胞为 PK-15 细胞。

**1.1.2 引物设计与合成:** 利用 Primer 5.0 引物分析软件, 根据 GenBank 收录 CSFV 全基因序列 (GenBank 登录号为: AF351433)中 NS3 编码区序列设计一对引物 fP 和 rP, 引物两端分别设有 Sac I 和 Xho I 酶切位点, 预计可扩增出 CSFV 基因组中 5142-7191 bp (长度为 2049 bp)的基因片段。

上游引物 fP: 5'-GATGAGCTCGGGCCTGCC GTTTGCAAGAAG-3'; 下游引物 rP: 5'-TCTCCTCG AGTTATAGACCA ACTACCTGTTT TAGTGC-3'。上、下游引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.1.3 主要试剂和耗材:** Pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 IPTG 购自北京鼎国生物公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和蛋白质分子量标准 (低)购自大连宝生物公司; Plus DNA Marker DL2000 购自北京全式金生物技术公司; DNA Marker 15000、质粒提取试剂盒、DNA 琼脂凝胶回收试剂盒和增强

型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自北京天根生化科技公司; High-Affinity Ni-NTA Resin 购自 Novagen 公司(产品目录号: 7097-3); 辣根过氧化物酶标记兔抗猪抗体购自 Sigma 公司(产品目录号: A5670); Costa ELISA 板(96 孔)购自华粤行仪器有限公司; 荧光标记山羊抗猪 IgG (H+L) 购自 KPL 公司(产品目录号: 02-14-06)。

## 1.2 方法

**1.2.1 pETNS3 原核表达载体的构建:** 采用 NS3 特异性上下游引物从质粒 pPOHCLV 中扩增 NS3 基因片段, 用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 分别对 NS3 PCR 产物和 pET-32a (+) 载体进行酶切, 用 T4 连接酶连接两者酶切产物。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌中, 采用 PCR 方法和酶切鉴定阳性克隆, 阳性克隆送至上海英俊生物技术公司进行测序。

**1.2.2 NS3 蛋白诱导表达与鉴定:** 将构建好重组原核表达载体 pETNS3 质粒转化到大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中, 挑单个菌落进行增菌培养, LB 液体培养基中添加 50  $\mu$ g/mL 浓度 Amp 和 1% 浓度葡萄糖, 30°C 条件下 140 r/min 培养 4 h 左右至对数生长期 (620 nm 吸光度为 0.6), 加入 IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 5–6 h 后收菌。分别取诱导和非诱导菌液 2 mL, 离心后收集细菌沉淀, 用 50  $\mu$ L PBS (0.05 mol/L pH 7.4) 悬浮细菌。样品加 2  $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液 50  $\mu$ L 混匀, 煮沸处理 5 min 后振荡裂解细菌, 稍离心后取上清进行 SDS-PAGE, 鉴定蛋白是否表达。取诱导培养菌液离心后弃上清收集细菌沉淀, 用 PBS (0.05 mol/L pH 7.4) 悬浮细菌后超声波裂解至清亮, 4°C 条件下 12000 r/min 离心 5 min, 分别取上清和沉淀悬浮液加 2  $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液混匀, 煮沸处理 5 min 后 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达方式。

**1.2.3 蛋白纯化:** 取 100 mL LB 液体培养基, 按照 1.2.2 中蛋白诱导表达条件进行大量诱导培养。取包涵体参照 Novagen 公司 High-Affinity Ni-NTA Resin 试剂盒说明书进行蛋白纯化, 取回收蛋白质样品加 2  $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液煮沸处理 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。回收蛋白样品采用分光光度计测定蛋白质浓度<sup>[9]</sup>, 加入 50% 甘油置 -20°C 保存备用。

**1.2.4 Western blotting 分析:** 按照 1.2.2 中方法诱导表达蛋白, 分别取诱导和非诱导全菌 SDS-PAGE, 参照常规 Western blotting 方法进行的操作, 最后采用

增强型 HRP-DAB 底物显色试剂进行显色<sup>[10–11]</sup>。

**1.2.5 间接 ELISA 方法初步建立:** 取纯化后重组蛋白 NS3 做包被抗原建立间接 ELISA 方法, 对照孔包被 pET-32a (+) 质粒诱导表达的硫氧还蛋白(带组氨酸标签重组蛋白 NS3 中包含此蛋白, 由本实验室纯化制备)。采用方阵法摸索 ELISA 最佳蛋白包被浓度和血清稀释浓度, 以及 ELISA 最佳反应条件<sup>[12]</sup>。在此条件下对参照阴阳性血清进行重复性试验, 用变异系数来判定试验的可重复性。

**1.2.6 间接 ELISA 在 CSFV 血清学检测中应用:** 用建立的 NS3-ELISA 方法检测不同年龄阶段的猪群血清样品 221 份, 将检测样品数据与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测数据进行对比, 比较两种方法之间的一致性。

将 CSFV 石门毒株接种 PK-15 细胞, 参照 IFA 常规方法建立起检测 CSFV 抗体的 IFA<sup>[13–14]</sup>。用 IFA 检测 NS3 间接 ELISA 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果存在差异的血清样品, 比较 3 种方法检测结果一致性。

## 2 结果

### 2.1 pET-NS3 质粒的构建

**2.1.1 PCR 扩增 NS3 基因:** PCR 扩增到 2000 bp 大小的目的条带(图 1), 与预计 NS3 基因片段大小一致。

**2.1.2 重组原核表达载体 pET-NS3 鉴定:** 挑取单个菌落进行 PCR 鉴定, 结果表明能扩增到大小约 2000 bp 多目的片段(图略)。挑取单个菌落增菌培养后提取

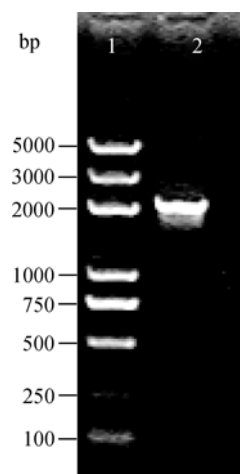


图 1 CSFV NS3 基因 PCR 扩增产物图

Fig. 1 Amplification of CSFV NS3 gene by PCR

Note: 1: DL2000 marker; 2: PCR amplification product from HCLV cDNA.

质粒, 用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 进行酶切鉴定(图 2), 酶切后得到 5300 bp 和 2000 bp 大小的片段。测序结果显示 NS3 基因插入位置、插入方向和阅读框正确, 结果表明重组原核表达载体 pETNS3 构建成功。

## 2.2 NS3 蛋白诱导表达、鉴定和蛋白纯化

SDS-PAGE 分析显示, NS3 蛋白在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌中成功表达, 主要以包涵体的形式表达, 部分以可溶性方式表达, 蛋白分子量大小为 95 kD 左右, 与预测的融合 NS3 蛋白大小基本一致(图 3)。回收后蛋白质样品进行 SDS-PAGE 鉴定纯度,

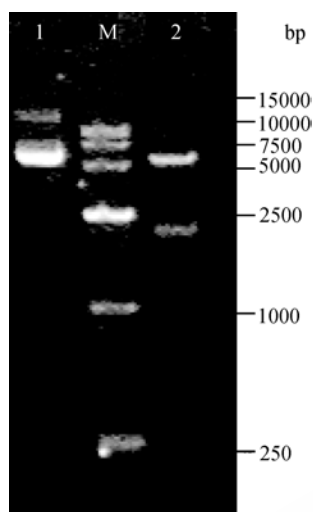


图 2 酶切鉴定重组 pET-NS3 质粒

**Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion**

Note: 1: Recombinant plasmid pET-NS3; M: DNA marker 15000; 2: Recombinant plasmid pET-NS3 digested with *Sac* I and *Xho* I.

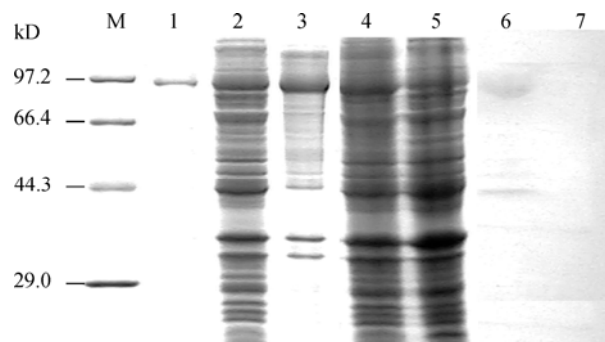


图 3 重组蛋白 NS3 在大肠杆菌 Rosetta(DE3)中诱导表达, 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 分析

**Fig. 3 SDA-PAGE analysis of recombinant NS3 protein expressed in *E. coli* Rosetta and the purified NS3 protein, and Western blotting analysis**

Note: M: Low molecular weight protein marker; 1: Purified recombinant NS3 protein; 2: Lysate supernatant of induced bacteria; 3: Lysate pellet of induced bacteria; 4: Lysate of induced bacteria; 5: Lysate of non-induced bacteria; 6: Western blotting for lysate of induced bacteria; 7: Western blotting for lysate of non-induced bacteria.

结果表明蛋白纯化效果较好, 纯度在 90% 左右, 测定蛋白质浓度为 1.0 mg/mL 左右(图 3)。

## 2.3 Western blotting 分析

结果显示: 与 SDS-PAGE 对比, pETNS3 转化 Rosetta (DE3) 诱导后在 Western blotting 对应位置出现特异性的条带, 而对照未诱导菌则无(图 3)。结果表明重组蛋白 NS3 能与阳性血清中抗体发生特异性抗原抗体反应。

## 2.4 间接 ELISA 方法建立

**2.4.1 间接 ELISA 条件的确定:** 经过方阵法摸索最佳 ELISA 条件, 最终确定条件如下: (1) 包被: 检测孔 NS3 蛋白包被量为 200 ng/孔, 对照孔包被硫氧还蛋白量为 40 ng/孔, 4°C 条件下包被 24 h 后甩干, 采用 PBST (PBS + 0.05% 吐温-20) 洗涤 2 遍; (2) 封闭: 封闭采用 PBST 稀释 5% 脱脂奶粉, 300  $\mu$ L/孔, 37°C 条件下封闭 2 h 后甩干, 用 PBST 洗涤 3 次; (3) 血清作用条件: 血清稀释液为 PBST 稀释 5% 脱脂奶粉, 添加 5% 的大肠杆菌裂解液, 100  $\mu$ L/孔; 血清做 50 倍稀释 (2  $\mu$ L/孔), 37°C 条件下孵育 1 h 后甩干, 用 PBST 洗涤 4 次; (4) 酶标兔抗猪抗体作用条件: 酶标兔抗猪抗体用 PBST 做 10000 倍稀释后, 100  $\mu$ L/孔, 37°C 条件下孵育 1 h 后甩干, 用 PBST 洗涤 4 次; (5) 底物显色: TMB 100  $\mu$ L/孔, 37°C 条件下作用 10 min 后加 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应; (6) 读数: 采用分光光度计吸光度 450 nm 下读取数据; (7) 结果判定条件: 在该条件下重复检测 OD 值为  $1.0 \pm 0.05$  血清样品确定为参考阳性血清样品, OD 值为  $0.1 \pm 0.05$  血清样品为参考阴性血清样品; 血清样品 S/P 值临界值为 0.3, S/P  $\geq 0.3$  判定为阳性, S/P < 0.3 判定为阴性。

**2.4.2 ELISA 重复性试验:** 按照确定好的 ELISA 条件, 用参考阳性血清和参考阴性血清进行批间重复性试验, 检验所建立 ELISA 的稳定性, 结果见表 1。结果显示: 参考阳性血清 10 次重复性试验后, NS3 检测孔 OD 值变异系数(CV%)为 3.8%, 对照孔 OD 值变异系数为 10.9%, 检测值变异系数为 4.2%; 参考阴性血清 NS3 检测孔 OD 值变异系数为 21%, 对照孔 OD 值变异系数为 10.5%, 检测值变异系数为 40.6%。结果表明参考阳性血清重复性检测变异性小, NS3 检测孔 OD 值和检测值变异系数均低于 10%, 检测结果具有很好的重复性; 而参考阴性血清重复性变异性大, 各个指标变异系数均大于 10%, 可能是由于各个指标的检测值数据过小而造成。

表 1 批间重复性试验结果  
Table 1 Repeatability of ELISA inter-batch test

检测批次 Detection	阳性参考血清样品 Positive reference serum			阴性参考血清样品 Negative reference serum		
	Positive	Reference	Sera	Negative	Reference	Sera
	NS3	control	OD	NS3	control	OD
1	1.055	0.111	0.944	0.122	0.073	0.049
2	1.117	0.116	1.001	0.086	0.056	0.030
3	1.147	0.119	1.028	0.091	0.060	0.031
4	1.003	0.112	0.891	0.095	0.060	0.035
5	1.182	0.111	1.071	0.103	0.073	0.030
6	1.181	0.144	1.067	0.151	0.085	0.066
7	1.103	0.133	0.990	0.132	0.072	0.060
8	1.112	0.139	0.973	0.129	0.069	0.060
9	1.074	0.109	0.965	0.075	0.063	0.012
10	1.136	0.170	0.966	0.155	0.063	0.092
CV (%)	3.8	10.9	4.2	21.0	10.5	40.6

**2.5 间接 NS3-ELISA 在 CSF 血清学检测中应用**  
**2.5.1 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab ELISA 检测试剂盒检测结果对比:** 采集不同猪场不同年龄阶段猪的血清样品 221 份进行检测, 检测数据结果与 IDEXX 公司 CSFV-Ab ELISA 检测试剂盒检测结果进行对比, 结果见表 2。数据显示: 221 份血清中 IDEXX 公司 CSFV-Ab ELISA 检测试剂盒检测抗体阳性为 108 份, 阴性 113 份; NS3-ELISA 检测抗体阳性 101 份, 阴性 120 份; 与 IDEXX 公司检测结果对比, NS3-ELISA 检测阳性血清符合率为 83.33%, 检测阴性血清符合率为 89.38%, 总符合率为 86.43%。结果表明本实验所建立的 NS3-ELISA 检测方法与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果存在较好的一致性。

表 2 NS3-ELISA 检测结果与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果对比 Table 2 The result of NS3-ELISA compared with CSFV-Ab test kit of IDEXX			
	阳性 Positive	阴性 Negative	总数 Total
IDEXX-ELISA	108	113	221
NS3-ELISA	101	120	221
符合数 Coincidence numbers	90	101	191
符合率 Coincidence rate (%)	83.33	89.38	86.43

**2.5.2 IFA 检测 NS3-ELISA 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果存在差异的血清样品:** 采用 IFA 检测 30 份 NS3-ELISA 和 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果差异样品, 结果见表 3。数据显示: NS3-ELISA 与 IFA 检测结果 17 份一

致, 分别为 9 份阳性和 8 份阴性样品, 占检测样品 56.67%; IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒与 IFA 检测结果 13 份一致, 分别为 11 份阳性和 2 份阴性样品, 占 43.33%。结果表明这些血清样品中 NS3 间接 ELISA 检测结果与 IFA 检测结果有较好的一致性。

3 讨论分析

3.1 NS3 蛋白分子生物学意义

本实验采用 Western blotting 分析表明重组蛋白 NS3 能与 CSFV 阳性血清发生免疫反应, 这与 Wen G 及鲁絮等实验研究结果一致<sup>[15-17]</sup>。CSFV 病毒的 NS3 蛋白是与 NS2 蛋白形成异二聚体分泌表达, NS2-3 蛋白是一种免疫优势蛋白, CSFV 疫苗毒株和野毒株感染动物后均能产生 NS2-3 抗体, 但 NS2-3 抗体不具有病毒中和活性<sup>[18]</sup>。E0 和 E2 是主要保护性抗原蛋白, 能诱导机体产生保护性抗体。随着基因工程疫苗技术的发展, 现研究开发出以 E2 作为抗原的标记基因工程疫苗和相应的鉴别诊断 ELISA<sup>[19-20]</sup>。大部分 CSFV 基因工程疫苗能够有效阻止保护易感猪群感染 CSFV, 但在实际临床应用中鉴别诊断 ELISA 在血清学检测方面存在检出率低的缺陷, 导致 CSFV 标记基因工程疫苗的应用受到限制<sup>[21]</sup>。本实验首次研究以 CSFV 重组蛋白 NS3 为抗原建立间接 ELISA, 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab ELISA 检测试剂盒和 IFA 检测结果有较高的一致性, 可以为 CSFV E2 基因工程标记疫苗提供一种新的鉴别诊断方法。

表 3 30 份 NS3-ELISA 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果差异样品及 IFA 检测结果  
Table 3 30 inconsistent serum samples detected by indirect NS3-ELISA compared with CSFV-Ab test kit of IDEXX, and the results detected by IFA

样 品 Sample	NS3-ELISA			IDEXX-ELISA			IFA
	OD	S/P	Result	OD	Blocking	Result	Result
1	0.520	0.550	pos	0.772	4	neg	pos
2	0.807	0.650	pos	0.947	12	neg	pos
3	0.627	0.510	pos	1.076	0	neg	pos
4	0.665	0.540	pos	1.151	-7	neg	pos
5	0.521	0.420	pos	1.011	6	neg	pos
6	0.857	0.856	pos	0.932	22	neg	pos
7	0.580	0.580	pos	0.831	30	neg	pos
8	0.338	0.379	pos	0.928	22	neg	pos
9	1.208	1.356	pos	0.893	22	neg	pos
10	0.564	0.584	pos	1.035	13	neg	neg
11	0.463	0.480	pos	1.116	7	neg	neg
12	0.223	0.215	neg	0.638	45	pos	neg
13	0.230	0.222	neg	0.298	74	pos	pos
14	0.193	0.186	neg	0.678	42	pos	neg
15	0.062	0.066	neg	0.433	46	pos	neg
16	0.153	0.162	neg	0.236	71	pos	neg
17	0.249	0.264	neg	0.293	64	pos	pos
18	0.346	0.280	neg	0.500	53	pos	pos
19	0.174	0.140	neg	0.323	60	pos	neg
20	0.194	0.157	neg	0.292	64	pos	neg
21	0.260	0.210	neg	0.391	51	pos	neg
22	0.221	0.220	neg	0.319	73	pos	pos
23	0.164	0.164	neg	0.393	67	pos	pos
24	0.244	0.244	neg	0.296	75	pos	pos
25	0.176	0.176	neg	0.183	85	pos	pos
26	0.232	0.232	neg	0.602	49	pos	pos
27	0.185	0.185	neg	0.442	63	pos	pos
28	0.197	0.220	neg	0.557	53	pos	pos
29	0.257	0.288	neg	0.244	69	pos	pos
30	0.376	0.169	neg	0.463	41	pos	neg

3.2 NS3 蛋白诱导表达

经过对 NS3 基因序列进行分析发现其含有近 10%的稀有密码子, 而且部分稀有密码子连续出现, 严重影响 NS3 蛋白在大肠杆菌中表达, 试验证明 pETNS3 在大肠杆菌 BL21 菌中表达受到限制。Rosetta (DE3)含有与 pET 相容的氯霉素抗性质粒, 能提供 AUA、AGG、AGA、CUA、CCC 和 GGA 等 6 种稀有密码子的 tRNA, 能改善稀有密码子造成的表达限制。这和鲁絮等<sup>[16]</sup>研究结果一致, 故本试验采用 Rosetta (DE3)作为宿主菌表达 pETNS3。NS3 蛋白本身分子量较大, 在宿主细菌中表达后具有一定的细胞毒性作用, 严重影响 NS3 蛋白表达量水平和蛋白纯化效果。硫氧还蛋白是大肠杆菌 trxA 基因表达产物, 以硫氧还蛋白融合蛋白形式表达的异源

蛋白能够正确折叠, 提高融合蛋白表达水平, 并表现出完整的生物学活性<sup>[9]</sup>。pET-32a (+)原核表达载体包 含硫氧还蛋白基因, 本研究证明了 NS3 在 pET-32a (+) 中表达量明显高于 pET-28a (+)。本实验中摸索优化 NS3 蛋白诱导表达的条件: 采用低温诱导, 30℃ 条件下 140 r/min 条件培养; 在 LB 液体培养基中加入 1%葡萄糖。结果证明在该条件下 NS3 蛋白表达量明显增加, 其中有部分 NS3 蛋白出现可溶性表达。

3.3 间接 ELISA 方法建立及应用

以大肠杆菌表达的融合蛋白为抗原建立的间接 ELISA 最主要缺点在于血清中抗体非特异性吸附, 造成检测过程中假阳性增加<sup>[22]</sup>。所以间接 ELISA 需要在对照孔中包被一种非相关蛋白, 以对照孔检测 OD 值作为本底来保证检测结果的准确性, 但是选

择对照孔包被蛋白的相关研究很少见报道。本试验表达的 NS3 融合蛋白中包含有硫氧还蛋白,以纯化后的硫氧还蛋白作为对照孔包被抗原,对研究解决间接 ELISA 中本底问题有重要意义。

IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒以其高敏感性和稳定性,是被公认为 CSFV-Ab 血清学检测行业标准。该试剂盒以全病毒为包被抗原,采用阻断 ELISA 方法,主要针对 CSFV 囊膜蛋白 E0 和 E2 特异性抗体检测。本试验所建立的间接 ELISA 是以重组蛋白 NS3 为包被抗原,检测血清中 CSFV NS3 蛋白特异性抗体,这两种 ELISA 存在着一定差异性。我国猪群长期免疫接种的 CSFV 疫苗为 HCLV,猪体内能产生针对 E0、E2 和 NS3 等免疫原性蛋白的特异性抗体,所以理论上检测这几种蛋白特异性抗体结果存在一致性。本试验建立的间接 NS3-ELISA 与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果存在较高的一致性证实了这种现象。30 份存在差异性的血清样品采用 IFA 进一步检测,结果发现 IFA 检测结果与间接 NS3-ELISA 和 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒检测结果符合率分别为 56.67%和 43.33%。推测造成这种差异性的原因可能是:这两种 ELISA 包被抗原和检测方法的差异性,导致判定结果存在一定的差异性;另一种可能是 HCLV 免疫后,由于自身的生物学特性猪体产生 NS3、E0 和 E2 等蛋白的特异性抗体存在时间先后顺序。以上原因有待进一步研究。总之,本试验所建立的间接 ELISA 检测结果与 IDEXX 公司 CSFV-Ab 检测试剂盒和 IFA 检测结果存在较高的一致性,具有较好的可重复性,可以作为 CSF 血清学诊断方法。

## 参 考 文 献

- [1] 涂长春. 猪瘟国际流行态势、我国现状及防控对策. 中国农业科学, 2003, 36(8): 955-960.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 652-664.
- [3] 韦平, 秦爱建. 重要动物病毒分子生物学. 北京: 科学出版社, 2008: 49-55.
- [4] Wiskerchen MM, Collett MS. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in Polyprotein processing. *Virology*, 1991(184): 341-350.
- [5] Sheng C, Xiao M, Geng XL, *et al.* Characterization of interaction of classical swine fever virus NS3 helicase with 3' untranslated region. *Virus Research*, 2007(129): 43-53.
- [6] Meyers G, Thie HJ. Molecular characterization of pestivirus. *Adv Virus Res*, 1996(47): 53-118.
- [7] Wensvoort G, Bloemraad M, Terpstra C, *et al.* An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 1988(17): 129-140.
- [8] 余兴龙, 涂长春, 徐兴然, 等. 猪瘟病毒兔化弱毒 (HCLV) 疫苗株基因组全长 cDNA 的克隆与序列分析. 高技术通讯, 2003(5): 38-42.
- [9] 科林根 JE, 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛, 等译. 北京: 科学出版社, 2007: 44-45; 182-185.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1723-1726.
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 166-188.
- [12] John R. Crowther. The ELISA Guidebook. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001.
- [13] Vallat B, Allen GP. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal, 5th ed(M). Paris, France: World Organisation for Animal Health (OIE), 2004: 7.
- [14] 崔尚金, 全滢平, 李曦, 等. 猪圆环病毒间接免疫荧光方法的建立. 中国预防兽医学报, 2007, 1(29): 63-66.
- [15] Wen G, Chen C, Luo X, *et al.* Identification and characterization of the NTPase activity of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 3 (NS3) expressed in bacteria. *Arch Viro*, 2007(152): 1565-1573.
- [16] 鲁絮, 张彦明, 许信刚. 猪瘟病毒石门株 NS3 基因在大肠杆菌中的表达. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(2): 15-18.
- [17] 鲁絮, 张彦明, 郑增忍, 等. 抗猪瘟病毒 NS3(p80)蛋白单克隆抗体的制备及其特性鉴定. 中国预防兽医学报, 2008, 6(30): 464-468.
- [18] 郑杰, 赵启祖, 赵耘, 等. 黄病毒 NS2-3/NS3 蛋白的结构与功能. 病毒学报, 2007, 5(23): 235-239.
- [19] Franziska W, Sandra R, Anja F, *et al.* Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines. *Journal of General Virology*, 2007(88): 2247-2258.
- [20] Yu XL, Tu CC, Li HW, *et al.* DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 2001(19): 1520-1525.
- [21] Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine*, 2007(25): 205-230.
- [22] 余传霖, 叶天星, 陆德源, 等. 现代医学免疫学. 上海: 上海医科大学出版社, 1998: 679-681.