

研究报告

猴免疫缺陷病毒抗体免疫梳检测方法的建立及应用

李丹丹¹, 王绥家¹, 陈平亚¹, 张体银^{2*}, 杨俊兴^{3*}, 刘忠梅⁴, 高慎阳⁵

(1. 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 海口 570311; 2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福州 350001; 3. 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心, 广东深圳 518001; 4. 黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 哈尔滨 150001; 5. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 辽宁锦州 121001)

【摘要】 目的 以基因工程技术制备猴免疫缺陷病毒(SIV)的 SIV30 蛋白作为抗原诊断试剂, 建立免疫梳方法(IC)用于特异性检测实验猴血清中抗 SIV 的抗体 IgG。**方法** 应用原核表达载体 pGEX-4T-1 构建 SIV SIV30 基因的重组表达质粒, 并在感受态细胞 BL21 中表达, 将该重组蛋白纯化后作为诊断抗原, 建立免疫梳标准化检测程序, 并应用于临床检测。**结果** 最佳抗原包被量为 0.02 mg/mL; 制备好的 IC 均能够特异性检测到相应的 SIV 阳性血清而不与其他病毒血清间发生交叉反应, 表明该检测方法特异性强; 敏感性分析结果表明, SIV30 蛋白能够敏感地检测到 1:400 倍稀释的 SIV 阳性血清; 稳定性和重复性试验结果表明, 同一样品重复检测 3 次, 变异系数(CV)均小于 10%; 利用该检测方法在对 10 份可疑猴血清样品进行检测, IC 与 ELISA 检测结果一致率为 100.0%, Kappa = 1.000。**结论** 原核表达了 SIV30 蛋白, 制备了 IC, 并应用于临床检测。该检测方法灵敏度高、特异性强、重复性好, 具有良好的实用性。

【关键词】 猴免疫缺陷病毒; SIV30 蛋白; 免疫梳; 快速检测方法; 抗体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 02-0217-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.013

Establishment and application of a new immune-comb assay for detection of serum antibody against simian immunodeficiency virus

LI Dandan¹, WANG Suijia¹, CHEN Pingya¹, ZHANG Tiying^{2*}, YANG Junxing^{3*},
LIU Zhongmei⁴, GAO Shenyang⁵

(1. Technical Center of Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570311, China.
2. Technical Center of Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350000.
3. Technical Center of Animal and Plant Inspection and Quarantine, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shengzhen 518001. 4. Technical Center of Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001. 5. Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001)

Corresponding author: ZHANG Tiying, YANG Junxing. E-mail: zhty5337@163.com

【Abstract】 Objective SIV30 protein of simian immunodeficiency virus (SIV) was prepared by genetic engineering technique as an antigen diagnostic reagent, to establish an immune comb method for the specific detection of anti SIV IgG in monkey serum. **Methods** Recombinant expression plasmid of SIV SIV30 gene was constructed by

【基金项目】 国家质检总局科技项目(No. 2013IK031, No. 2013IK051, No. 2015IK089); 福建省科技计划重点项目(No. 2014N0001); 海南省应用技术与开发专项项目(No. ZDXM20130025); 广东检验检疫局科技计划项目(No. 2011GDK44, No. 2013GDK04)。

Funded by Science and Technology Project of AQSIQ (No. 2013IK031, No. 2013IK051, No. 2015IK089), Key Projects of Science and Technology Plan of Fujian Province (No. 2014N0001), Special Project on Applied Technology Research and Development in Hainan Province (No. ZDXM20130025), Science and Technology Project of Guangdong Inspection and Quarantine Bureau (No. 2011GDK44, No. 2013GDK04)。

【作者简介】 李丹丹(1979—), 女, 博士, 高级兽医师, 研究方向: 分子病毒学。E-mail: 108074182@qq.com

【通信作者】 张体银(1979—), 男, 高级工程师, 研究方向: 分子病毒学; 杨俊兴(1978—)男, 研究员, 研究方向: 分子病毒学。E-mail: zhty5337@163.com

prokaryotic expression vector pGEX-4T-1, and expressed in the competent BL21 cells. The recombinant protein was purified as a diagnostic antigen, and a standardized procedure for the detection of immune comb was established and applied for clinical detection. **Results** The optimum coating amount of antigen was 0.02 mg/mL. The prepared IC was able to specifically detect the positive serum of SIV. There was no cross reaction between the sera of other viruses. It showed a high specificity of the detection method. Sensitivity analysis showed that the SIV30 protein was able to detect 1:400 times diluted SIV positive sera. The result of stability and repeatability test (the same sample was repeated 3 times) showed that the coefficient of variation (CV) was less than 10%. The serum samples of 10 suspicious monkeys were detected by this method, showing a consistent rate of comb method and ELISA test result of 100%, Kappa = 1.000.

Conclusions SIV30 protein is expressed in prokaryotic cells. The immune comb is prepared, and is successfully applied in clinical examination. It shows that the method has a high sensitivity, strong specificity, good reproducibility and practicability.

[Key words] simian immunodeficiency virus; SIV30 protein; immune comb; IC; a rapid assay; IgG

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 是一种外源性逆转录病毒, 对人具有潜在的感染性^[1]。SIV 感染繁殖猴群将直接影响其在生物医学研究中的应用^[2]。因此, 实验猴输入国、出口国的检疫要求都明确规定实验猴 SIV 抗体必须为阴性^[3]。目前, 除了美国 BioReliance 和 VRL 等少数几个实验室拥有实验猴 SIV 的 ELISA 试剂盒之外, 市场上还没有同类产品出售。国外试剂盒虽然准确率高, 但价格昂贵, 若进行大规模的 SIV 血清学调查, 国内实验猴养殖单位难以承受, 因此往往只对即将出口的实验猴购买少量国外试剂盒做一次性检测。如果能够建立一种快速、准确的实验猴 SIV 抗体检测方法, 并研制出操作简单、准确率高、价格低廉的试剂盒, 将有助于国内开展实验猴 SIV 的检测工作。

免疫梳方法 (immune comb, IC) 是能够对病毒血清抗体进行定性、定量检测的一项新型体外诊断技术, 这种技术突破性地将病毒抗原点布在具有极强蛋白吸附力的硝酸纤维素膜上, 把包被好的抗原膜贴附于 PVC 板以增加膜的强度和硬度, 经机器裁切制成免疫梳。将此免疫梳插入稀释好的待检血清样本时, 特异性抗体与抗原结合并固着于膜上, 再通过酶标二抗底物反应, 染色后, 抗体阳性的样本表现为肉眼可见的红色斑点, 阴性则无颜色变化。膜经过图像处理系统数据化后可以定量分析。该方法具有快速、简便、经济、不需任何特殊仪器, 保留了常规 ELISA 的敏感、特异的优点, 又克服了许多繁琐的操作, 节省了操作时间, 缩短了实验周期, 完全可在野外进行实地诊断检测, 达到快速诊断的目的, 能够满足口岸机场、码头的快速通关检测, 在基层具有良好的运用推广前景。本研究利用

基因工程技术制备 SIV 的 SIV30 基因原核表达产物重组 SIV30 蛋白作为抗原诊断试剂, 建立免疫梳方法用于对实验猴血清中抗 SIV 的抗体 IgG 进行特异性检测, 为快速准确检测 SIV 抗体提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及试剂

pMD18-T Vector、*E. coli* DH5 α 、感受态细胞 (competent cell) 和 pGEX-4T-1 购于宝生物工程 (北京) 有限公司; BL21 (DE3) pLysS 感受态表达菌购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 2 $\times$ Taq MasterMix (含染料)、DL2000 DNA marker、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购于康为世纪生物科技有限公司; IPTG、NC 膜、显色液为北京索莱宝科技有限公司产品; T₄ DNA Ligase、*Eco*R I、*Sma* I 为 NEB 产品; 猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猴 D 型反转录病毒 I 型 (SRV1)、猴 B 病毒、猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型 (STLV1) 和猴麻疹病毒 (MeV) 阳性血清由海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心保存。

1.2 引物的设计与合成

根据已发表的国内外相关参考文献进行初步理论筛选, 之后登录 GenBank 获取 SIV 的参考序列 (GenBank: M92714.1) 在 61aa-76aa 处标识目标氨基酸序列 SEGCTPYDINQMLNCV, 编码衣壳蛋白基因为 TCAGAAGGCTGCACTCCCTATGACATCAATCAATGCTAAATTGTGTA, 在确定目标抗原表位序列位置大小之后, 为提高目标抗原表位的合成效率利用 OLIGO 7 软件设计重复串联抗原表位基因序列, 如下: GAATTCTCAGAAGGCTGCACTCCCTATGACATCAATCAATGCTAAATTGTGTATCAGAAGGCTGCAC

TCCCTATGACATCAATCAAATGCTAAATTGTGTACTCGAG。利用交叠延伸 PCR (SOE-PCR) 的原理设计扩增 SIV 表位序列的 SOE-PCR 扩增引物^[4-5]; 引物序列如下: SIVF: GAATTCTCAGAAGGCTGCACTCCCTATGACATCAATCAAATGCTAAATTGTGTATCAGA; SIVR: CTCGAGTACACAATTTAGCATTTGATTGATGTCATAGGGAGTGCAGCCTTCTGATACAC。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 SIV30 蛋白的表达与鉴定

1.3.1 目的基因的扩增与重组表达质粒的构建

按照交叠延伸 PCR 原理进行 1~2 轮 PCR 核酸扩增以此获得目标病毒表位基因序列^[5-6]。用 Sma I 与 EcoR I 同时分别双酶切含有 SIV 表位基因的克隆质粒 pMD18T-SIV 和表达载体 pGEX-4T-1, 胶回收酶切的目的片段。T4 DNA 连接酶连接回收后的 PCR 产物, 16℃ 过夜, 转入表达菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞中, 利用氨苄西林抗性筛选阳性菌落并提取质粒进行酶切鉴定, 阳性菌体命名为 pGEX-4T-SIV。

1.3.2 重组质粒的诱导表达及鉴定

将经测序鉴定后的阳性重组菌 pGEX-4T-SIV/BL21 (DE3) 10 μL 接种到 5 mL 含有 25 μg 的氨苄西林的 LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 摇菌培养至 A₆₀₀ 值为 0.5~1.0 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 继续同条件下诱导培养 5 h, 取 1 mL 菌液, 离心后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳; 取诱导表达后 5 h 的菌体, 超声破碎, SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.3 目的蛋白的纯化和 Western blot 鉴定

采用 KCl 染色切胶纯化方法进行表达产物的纯化。将诱导后的重组菌 pGEX-4T-SIV/BL21 (DE3) 进行 SDS-PAGE 电泳检测表达情况, 然后用 0.25 mol/L 的 KCl 溶液染色胶片 5 min; 小心切下染成银白色的目的条带并用 PBS 洗 3 次, 最后将胶条碾碎后置于 EP 管中, 加 PBS 500 μL 振荡混匀, -20℃ 反复冻溶 3 次, 12 000 r/min 离心 2 min; 取上清液即为纯化的融合表达蛋白, 采用 BAC 方法进行蛋白定量, 调整深度后的蛋白溶液进行分装, 保存, 备用, 并进行 Western blot 鉴定^[7]。

1.3.4 Western blot 确定最佳抗原包被量

固定阳性血清浓度 (1:50), 将纯化定量后的目的蛋白进行 10⁰⁻⁶ 梯度稀释包被 NC 膜, 然后进行 western blot 分析^[7], 筛选最佳抗原包被量。即先将纯化蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳, 再并按常规方

法进行蛋白转印。WB 鉴定时用 SIV 的阳性血清为一抗, 室温孵育 1 h, 再用兔抗猴 IgG/HRP 为二抗, 室温孵育 1 h, 最后用 BICP/NBT 进行底物显色。

1.3.5 表达蛋白的 Western blot 特异性检测

以上述抗原最佳包被量为标准, 进行表达蛋白的特异性检验。选择将 SIV 阳性血清做待检一抗进行 Western blot 特异性检测。

1.3.6 表达蛋白的 Western blot 敏感性检测

将 SIV 阳性血清进行 2 倍倍比稀释 (1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800) 分别进行 Western blot 敏感性检验, 确定最大检测稀释度。

1.3.7 免疫梳检测试纸的制备

根据上述试验方法确定的抗原最佳包被浓度参数, 将 SIV 抗原分别进行线性包被 NC 膜, 将膜晾干。用 5% BSA 封闭液封闭 NC 膜过夜, 弃去封闭液后再次晾干。将包被好的 NC 膜裁剪成 10.5 mm × 4 mm 标准尺寸的试纸条, 依次按 4.5 mm 间距整齐固定于 150 mm × 1 mm 的 PVC 板上, 12 条为一组或直接裁剪包被好的 NC 膜制成 IC, 最终于自封袋中 4℃ 保存备用。

1.3.8 IC 的使用方法与判定方法

将 1:25 倍稀释的待检血清样品转移至 96 孔酶标反应板中, 标记顺序号。IC 方法具体的操作步骤和判定方法参照张强等^[7]的 Western blot 检测方法进行。

1.3.9 IC 检测的特异性鉴定

按照优化后的 IC 操作程序, 分别对 SIV、MeV、SRV1、BV 和 STL V1 阳性血清 1:50 倍稀释用作特异性检验, 判断本方法的特异性。

1.3.10 IC 检测的敏感性试验

将阳性对照和阴性对照血清进行 1:50 倍稀释各 0.5 mL, 再将 SIV 阳性血清分别从 1:25~1:6400 进行倍比稀释, 按照优化后的 IC 操作程序进行检测, 确定该方法的灵敏度。

1.3.11 IC 的重复性与稳定性检测

IC 的重复性检测: 在同一批试验中每份样品平行作 3 次 (批内), 在 3 个不同试验日重复测定 6 份样品 (批间)。分别统计分析批内和批间重复试验变异系数情况; IC 的稳定性检测: 将同一批次 3 条 4℃ 保存, 分别在 1、3 和 6 个月的间隔与新制备的 IC 同时对猴 SIV 的阴、阳性血清进行检测, 统计分析 IC 的特异性与敏感性没有明显变化, 并再次对同一份样品平行作 3 次进行比较分析其稳定性。

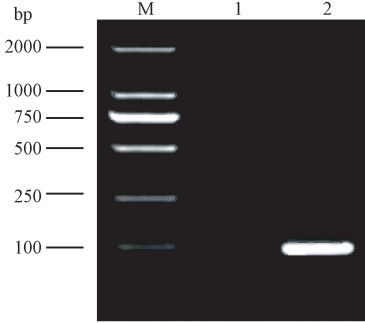
1.3.12 IC 实践应用比较检测评价

根据上述 IC 的使用描述方法和判定标准,将混有已知 SIV 的阳性血清与阴性血清分装标记后,利用制备的 IC 与 ELISA 方法分别进行检测比较,以此验证其可靠性。

2 结果

2.1 SIV 病毒抗原表位基因的 PCR 扩增结果

SIV30 基因特异性引物经 PCR 扩增后,得到了约 96 bp 的目的片段,与预计片段大小相符(图 1)。



注:1. 水对照;2. 扩增片段 96 bp。
图 1 扩增片段产物 M: DNA marker 2000
Note. M. DNA marker 2000. 1. Water control. 2. Amplified fragment 96 bp.
Fig.1 Amplification of SIV30 gene fragment by PCR

2.2 SIV30 基因测序结果

DNA 序列测定结果表明,所获得序列长度为 96 bp,与 GenBank 上登录的相应序列完全一致。

2.3 重组表达质粒 pGEX-4T-SIV 的鉴定

将表达质粒 pGEX-4T-SIV 经 SmaI/EcoRI 双酶切和电泳后,获得的条带大小符合预期,结合最终的测序结果进一步验证,表明重组表达质粒构建正确,结果如图 2 所示。

2.4 SIV 表位抗原蛋白的 SDS-PAGE 分析结果

pGEX-4T-SIV 融合蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3 所示,目的病毒表位抗原获得表达,大小范围符合预期 29 ku。

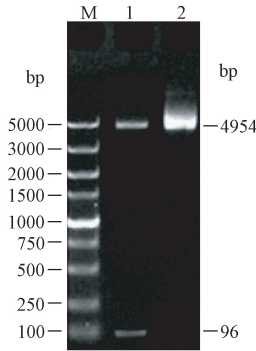
2.5 SIV 表位抗原蛋白的纯化结果

将 SIV 重组表位抗原表达产物进行切胶回收后再次进行 SDS-PAGE 电泳,分析纯化回收情况,结果如图 4 所示,SIV-30 蛋白成功回收且纯度均一。(图 4)

2.6 Western blot 确定 SIV 抗原最佳包被量结果

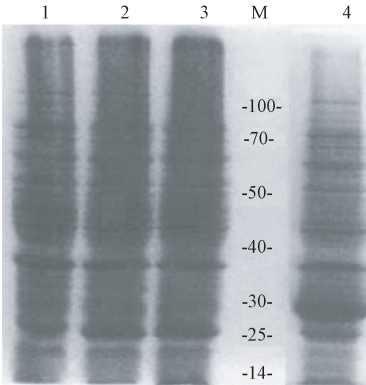
将纯化回收的重组 SIV30 蛋白浓度调整至 2 mg/mL 作为起始检测量,依次进行 10⁰⁻⁵ 稀释,分别进行 Western blot 分析检测,结果表明最大检测极

限为 10³ 稀释倍数的量浓度(2 μg/mL)。从肉眼可见度判定,以 10² 稀释倍数的量浓度(0.02 mg/mL)确定为最佳包被量。(图 5)



注:M. DNA Marker DS 5000 Ladder;1. 经 SmaI 和 Eco R I 双酶切的 pGEX-4T-SIV 重组质粒;2. 质粒 pGEX-4T-SIV。
图 2 pGEX-4T-SIV 重组质粒的酶切鉴定
Note. M. DNA marker DS 5000 ladder. 1. pGEX-4T-SIV plasmid was digested with restriction endonuclease SmaI and Eco R. 2. pGEX-4T-SIV plasmid.

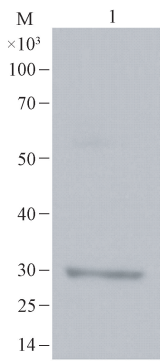
Fig.2 Restriction enzyme digestion map of the recombinant plasmid



注: M. 蛋白 marker;1 ~ 3. pGEX-4T 空载体诱导表达菌;4. pGEX-4T-SIV 诱导表达菌。
图 3 表达产物的 10% SDS-PAGE 电泳
Note. M. Protein molecular standard. 1 ~ 3. pGEX-4T induced expression product. 4. pGEX-4T-SIV induced expression.
Fig.3 10% SDS-PAGE electrophoresis of expressed products

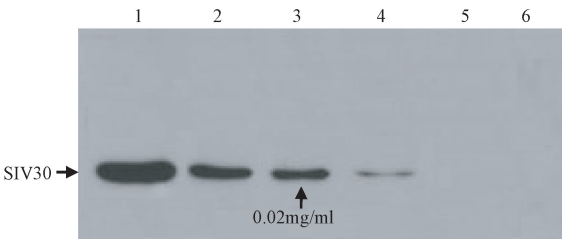
2.7 重组 SIV30 蛋白抗原特异性分析结果

将纯化回收的重组 SIV30 蛋白以 0.02 mg/mL 量浓度的最佳包被量进行 Western blot 分析结果表明,重组 SIV30 能够特异性地识别 SIV 阳性血清而不与其他猴病毒阳性血清发生交叉反应,说明 SIV30 抗原特异性良好。(图 6)



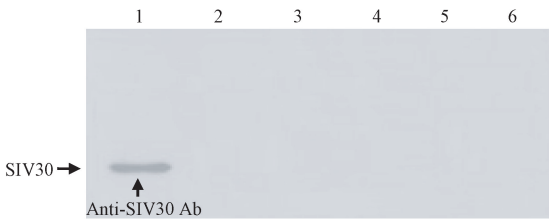
注:M. 蛋白 marker;1. 纯化后的 pGEX-4T-SIV 表达菌。
图 4 融合蛋白纯化后的 10% SDS-PAGE 电泳
Note: M. Protein marker. 1. Purified product of pGEX-4T-SIV.

Fig.4 10% SDS-PAGE electrophoresis of purified products



注:1~6 分别代表 SIV30 包被浓度,即,2 mg/mL、0.2 mg/mL、0.02 mg/mL、2 μg/mL、200 ng/mL、20 ng/mL 和 2 ng/mL。
图 5 重组 SIV30 蛋白抗原最佳包被量确定
Note. 1~6. Protein coating concentration, 2 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.02 mg/mL, 2 μg/mL, 200 ng/mL, 20 ng/mL and 2 ng/mL, respectively.

Fig.5 Determination of the optimal coated amount of recombinant SIV30 protein



注:1~6. 分别代表 SIV30 蛋白与 SIV 阳性血清,SRV1 阳性血清,猴 B 病毒阳性血清,STLTV1 阳性血清和 MeV 阳性血清免疫反应的结果。
图 6 重组 SIV30 蛋白抗原特异性 Westernblot 分析结果
Note. 1~6. Results of immunoreactivity of SIV30 protein and SIV positive serum, SRV1 positive serum, BV positive serum, STLTV1 positive serum, SIV negative serum, respectively.

Fig.6 Antigen specificity of recombinant SIV30 protein analyzed by western blot

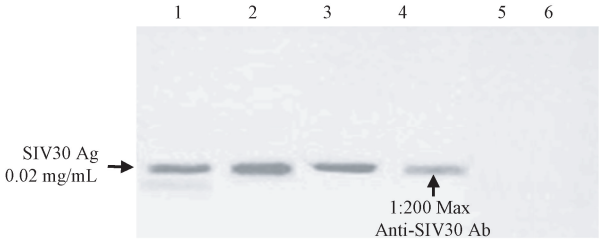
2.8 重组 SIV30 蛋白抗原敏感性分析结果

将纯化回收的重组 SIV30 蛋白以 0.02 mg/mL

量浓度的最佳包被量进行 Western blot 敏感性分析结果表明,重组 SIV30 蛋白能够敏感地检测到 1:200 稀释的 SIV 阳性血清,由此说明重组 SIV30 蛋白抗原敏感性良好。(图 7)

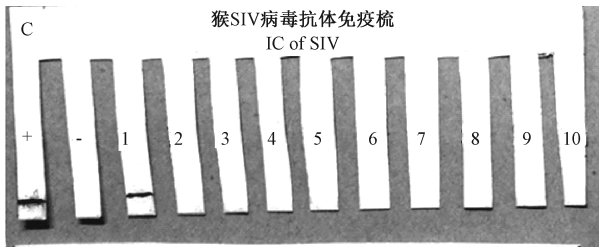
2.9 制备的 IC 特异性检验结果

在根据上述 Western blot 分析确定的 SIV 抗原最佳包被量及其特异性与敏感性的分析基础之上,将制备好的 IC 进行特异性评价。检验的结果如图 8 所示,IC 均能够特异性检测到相应的 SIV 阳性血清而不与其他病毒阳性血清间发生交叉反应,由此说明设计制备的 IC 特异性良好。



注:1~6. 分别代表 SIV30 抗原与 1:25/50/100/200/400/800 倍稀释的 SIV 阳性血清反应结果。
图 7 Western blot 分析重组 SIV30 蛋白抗原敏感性
Note. 1~6. Results of immunoreactivity of SIV30 protein and 1:25/50/100/200/400/800 times diluted SIV positive serum, respectively.

Fig.7 Sensitivity of recombinant SIV30 protein analyzed by Western blot



注:“+/-”代表 1:50 猴 SIV 阳性/阴性血清抗体对照,1 代表 1:50 抗猴 SIV 阳性血清;2~6 分别代表抗猴 1:25 的 BV, SRV1, MeV, STLTV1 阳性血清和 SIV 阴性血清参照,7~10 分别代表 1:50 的抗猴 BV, SRV1, STLTV1 和 MeV 阳性血清参照。
图 8 IC 的特异性检测结果

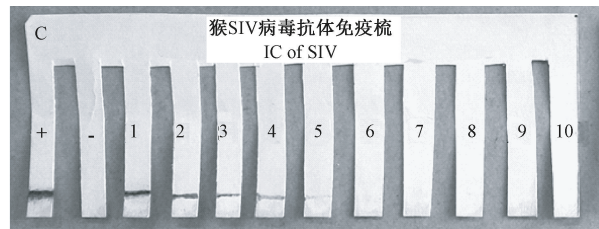
Note. “+/-”. 1:50 SIV positive/negative serum. 1. 1:50 anti SIV positive serum. 2~6. 1:25 anti BV/SRV1/ MeV /STLTV1 positive serum and 1:25 anti SIV negative serum. 7~10. 1:50 anti BV, SRV1, STLTV1 and MeV positive serum.

Fig.8 Detection of the specificity of IC

2.10 制备的 IC 敏感性检验结果

在根据上述 western blot 分析确定的 SIV 抗原最佳包被量及其特异性与敏感性的分析基础之上,

对制备好的 IC 进行敏感性评价。检验的结果如图 9 所示: SIV 抗体 IC 的最大血清阳性检测稀释度为 1:400, 由此说明设计制备的 IC 敏感性良好达到了预期。



注: “+/-”代表 1:50 猴 SIV 阳性/阴性血清抗体对照, 1-9 分别代表 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 以及 1:6400 倍的抗 SIV 阳性血清, 10 代表空白对照。

图 9 IC 的敏感性检测结果

Note. “+/-”. 1:50 SIV positive/negative serum. 1-9. 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 and 1:6400 anti SIV positive serum. 10: Blank control.

Fig. 9 Detection of the sensitivity of IC

2.11 IC 重复性和稳定性

IC 的重复性检测: 在同一批试验中每份样品平行作 3 次(批内), 在 3 个不同试验日重复测定 6 份样品(批间)。批内重复试验变异系数(CV)为 4.635 511% 小于 7%, 批间重复试验 CV 为 5.563 486% 小于 10%, 说明 IC 的重复性良好。IC 的稳定性检测: 将同一批次 3 条 4℃ 保存, 分别在 1、3 和 6 个月的间隔与新制备的 IC 同时对 SIV 的阴、阳性血清进行检测。结果, IC 的特异性与敏感性没有明显变化, 对同一份样品平行作 3 次进行比较, CV 为 5.691 788% 均小于 10%, 说明 IC 的稳定性良好。

2.12 临床测试比较结果

为了进一步检验制备的 IC 在实践中检测的可靠性, 以商品化的 ELISA 试剂盒为参照对临床采集的 10 份可疑猴血清样品进行对比检验分析, 结果表明, 新建立的 IC 方法与 ELISA 方法同样都检测出 1 份阳性猴血清样品和 9 份阴性猴血清样品, 检测结果一致率为 100.0%, Kappa = 1.000, 显示出本研究建立的 IC 具有良好的实用性和可靠性。

3 讨论

SIV 主要破坏猴机体的免疫系统, 猕猴感染 SIV 后期可能引发猴艾滋病(SAIDS), SAIDS 对猕猴具有很高的致死性, 威胁猴群健康^[8]。在猴群中进行血清抗体检测, 是防止病毒传播流行的有效途

径^[9]。目前, 国内外用于 SIV 抗体的检测, 最常见的方法有 ELISA、WB 和 IFA 等^[10]。ELISA 方法灵敏度、特异性和准确性都较好, 但是也存在一些局限: 每次仅能检测一种病毒抗体, 如果需要同时检测多种病毒抗体时, 则检测费用较为昂贵并且费时, 完成检测所需的样本量较大, 非常浪费, 对于一些量少的样本就比较困难。WB 操作步骤繁琐, 反应性低并会出现非特异性条带, 从而在一定程度上也限制了其使用范围。只有在验证 ELISA 等实验结果时才使用此法, 显然用于整个猴群的大规模监测是不实际的。IFA 是一种借助荧光显微镜检查来观察抗原-抗体特异性结合反应的检测方法。由于免疫荧光法具有抗体特异性, 且在荧光显微镜检查之前只需较短时间的反应过程, 因而它是一种快速筛选实验猴病毒的方法。但免疫荧光检测的结果不易判定, 需经专门训练的人员操作, 所以在一定程度上限制了这种方法的使用范围。

美国 VRL 公司现已研制出 SIV 抗体检测试剂盒, 准确率较高, 但价格非常昂贵且仅限于实验室使用, 若对进出境的实验猴进行大规模 SIV 抗体的血清学调查, 国内实验猴养殖单位难以承受。IC 与传统玻片法及 ELISA 相比, 特异性抗原的使用克服了玻片法所用抗原质量问题所导致的假阳性和假阴性问题; 染色结束后的 IC 结果直观, 肉眼即可观察判断, 无需酶联免疫检测仪测定 A 值, 而且该 IC 可以长期保存以便后期复查。该方法具有快速、简便、经济、不需任何特殊仪器, 保留了常规 ELISA 的敏感、特异的优点, 又克服了许多繁琐的操作, 节省了操作时间, 缩短了实验周期, 完全可在野外进行实地诊断检测, 达到快速诊断的目的, 能够满足口岸机场、码头的快速通关检测, 在基层具有良好的运用推广前景。

近年来, 基因工程重组技术和免疫标记技术的不断发展、成熟, 使多种动物源性病原及抗体的快速诊断试剂的研制与开发成为了可能^[11]。因此, 本研究根据自身已有的病毒结构蛋白的系统研究经验, 建立了以表位抗原为基础的特异性针对 SIV 血清抗体检测的 IC, 并进行了初步临床比较应用研究。试验结果表明 IC 具有准确、快速、简便的优点。与 ELISA 相比, 二者临床检测结果符合率达 100.0%, 显示出良好的实用性和可靠性。这为实验猴 SIV 血清抗体检测提供了一种可靠的检测手段。

参考文献 (References)

[1] 丛喆, 涂新明, 李兆忠. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法

- 测定猴免疫缺陷病毒(SIV)前病毒 DNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 680-690.
- Cong Z, Tu XM, Li ZZ, et al. Quantitation of simian immunodeficiency virus (SIV) proviral DNA load using real-time quantitative PCR with SYBR green I [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(11): 680-690.
- [2] 王卫, 刘强, 许琰, 等. SHIV-KB9 感染中国恒河猴动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(2): 1-6.
- Wang W, Liu Q, Xu Y, et al. Establishment of a Chinese-origin rhesus macaque model of SHIV-KB9 virus infection [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(2): 1-6.
- [3] 孙敏, 魏强, 梁成珠, 等. SIVp27 抗原双抗体夹心 ELISA 检测方法的研究 [J]. 中国动物检疫, 2007, 24(4): 32-35.
- Sun M, Wei Q, Liang CZ, et al. Study on a sandwich ELISA for detection of SIV p27 antigen [J]. China Animal Health Insp, 2007, 24(4): 32-35.
- [4] Villinger F, Powell JD, Jehuda-Cohen T, et al. Detection of occult simian immunodeficiency virus SIVsmm infection in asymptomatic seronegative nonhuman primates and evidence for variation in SIV gag sequence between in vivo- and in vitro-propagated virus [J]. J Virol, 1991, 65: 1855-1862.
- [5] Huang H, Wen Q, Gao Q, et al. An efficient and rapid method for cDNA cloning from difficult templates using codon optimization and SOE-PCR; with human RANK and TIMP2 gene as examples [J]. Biotechnol Lett, 2013, 33: 1939-1947.
- [6] Tan L, Chen H, Ye S, et al. A SOE-PCR method of introducing multiple mutations into Mycoplasma gallisepticum neuraminidase [J]. J Microbiol Methods, 2013, 94: 117-120.
- [7] 张强, 张雪寒, 何孔旺, 等. ETEC F4-F5 融合基因表达及间接 ELISA 方法建立 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(8): 1312-1317.
- Zhang Q, Zhang XH, He KW, et al. Development of an indirect ELISA for detecting specific antibody against ETEC F4-F5 fusion protein [J]. Chin J Vet Sci, 2016, 36(8): 1312-1317.
- [8] 李敏, 马兰芝, 白杰英, 等. 猴免疫缺陷病毒衣壳蛋白 p27 在大肠杆菌中的表达及纯化 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(1): 1-4.
- Lil M, Ma LZ, Bai JY, et al. Expression and purification of SIV capsid p27 in E. coli [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(1): 1-4.
- [9] Hara M, Sata T, Kikuchi T, et al. Isolation and characterization of a new simian retrovirus type D subtype from monkeys at the Tsukuba Primate Center, Japan [J]. Microbes Infect, 2013, 7(1): 126-131.
- [10] 周亚敏, 李绍东, 段幸生. 云南省野生恒河猴病毒血清流行病学研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2012, 21(3): 1-6.
- Zhou YM, Li SD, Duan XS. Seroepidemiological study on viruses of the wild rhesus monkeys in Yunnan Province [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci), 2012, 21(3): 1-6.
- [11] 李雯. 猴免疫缺陷病毒 p27 基因的克隆、表达、单克隆抗体制备及鉴定 [D]. 博士学位论文, 华中科技大学, 2013, 1-73.
- Li W. The preparation and identification of monoclonal antibodies for p27 gene of simian immunodeficiency virus [D]. Doctoral Dissertation, Huazhong University of Science and Technology, 2013, 1-73.

[收稿日期] 2017-10-24