



生物实验室

检测牛冠状病毒抗体间接 ELISA 方法的建立与应用

胡林杰[△] 孟野[△] 周玉龙* 贾伟强 翟海瑞 武瑞 侯喜林

黑龙江八一农垦大学动物科技学院 黑龙江 大庆 163319

摘要:【背景】牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)是引起新生犊牛死亡的主要病原之一,有效的检测手段是防治该病的前提。目前 BCoV ELISA 检测方法存在敏感性低、不稳定等缺陷。【目的】对原有 BCoV ELISA 方法进行改进,建立间接 ELISA 检测方法。【方法】应用我国 BCoV 流行毒株 CD 株 *n* 基因为模板,预测 N 蛋白抗原表位,通过原核表达制备可溶性的重组 N 蛋白作为抗原,建立间接 ELISA 方法,应用该方法对黑龙江省 2010–2017 年的 BCoV 感染进行血清流行病学调查。【结果】该 ELISA 方法最佳工作条件为:用 50 mmol/L pH 9.6 碳酸盐作为包被液,抗原包被浓度 2.5 μg/mL;用 PBST 作为样本稀释液,稀释浓度 1:50, 37 °C 孵育 1.5 h;HRP-羊抗牛 IgG 稀释浓度 1:7 500, 37 °C 孵育 1.0 h;用 1%明胶 37 °C 封闭 30 min。阴阳性临界值为 0.225。该方法与 BRV、BRSV、BVDV、IBRV、BPIV3 和 *E. coli* 阳性血清均无交叉反应。批内和批间变异系数均小于 10%,与病毒中和试验的符合率高达 93.5%。对黑龙江省部分地区共 603 份奶牛血清样品检测结果显示,BCoV 抗体阳性率为 98.84%。【结论】建立的 ELISA 方法特异性强、敏感性高、稳定性好,为进一步研发 ELISA 试剂盒提供了技术基础。

关键词: 牛冠状病毒, 核衣壳蛋白, ELISA, 流行病学

Foundation items: Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Heilongjiang Province (201810223004); Natural Science Talent Support Program of Heilongjiang Bayi Agricultural University (ZRCPY201807); Postdoctoral Fund of Heilongjiang Province (LBH-Z18258); State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology Foundation (SKLVBF2018XX); Postdoctoral Funds of Heilongjiang Bayi Agricultural University; Talent Support Program of Heilongjiang Bayi Agricultural University (XDB201820)

[△]These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: zhouyulong1980@163.com

Received: 14-05-2019; **Accepted:** 04-09-2019; **Published online:** 27-09-2019

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划(201810223004); 黑龙江八一农垦大学自然科学人才支持计划(ZRCPY201807); 黑龙江省博士后基金(LBH-Z18258); 兽医生物技术国家重点实验室开放基金(SKLVBF2018XX); 黑龙江八一农垦大学博士后经费; 黑龙江八一农垦大学人才启动计划(XDB201820)

[△]对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: zhouyulong1980@163.com

收稿日期: 2019-05-14; 接受日期: 2019-09-04; 网络首发日期: 2019-09-27

Establishment and application of indirect ELISA for detection of bovine coronavirus antibody

HU Lin-Jie[△] MENG Ye[△] ZHOU Yu-Long* JIA Wei-Qiang ZHAI Hai-Rui WU Rui
HOU Xi-Ling

College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing,
Heilongjiang 163319, China

Abstract: [Background] Bovine coronavirus (BCoV) is one of the main causes of neonatal calf death, and effective detection is the prerequisite to prevent and control the disease. [Objective] At present, BCoV ELISA detection method has some defects, such as low sensitivity, instability and so on. This study aims to improve these deflections to establish indirect ELISA detection method. [Methods] The method of indirect ELISA was established by using the soluble recombinant N protein of the epidemic BCoV-CD strain as an antigen. The epitope of the N protein was predicted by DNASTar soft, and was prepared by prokaryotic expression in the non-denatured condition. The seroepidemiological investigation of BCoV infection in Heilongjiang province in recent 5 years was carried out by using this method. [Results] The optimum working conditions of the ELISA method were as follows: the coating solution was 50 mmol/L pH 9.6 carbonate, and the antigen coating concentration was 2.5 µg/mL; The sample diluent was PBST, the dilution concentration was 1 µg/mL, and incubated at 37 °C for 1.5 h; The dilution concentration of HRP-labeled secondary antibody was 1:7 500, and incubated at 37 °C for 1.0 h; The blocked condition was 1% gelatin at 37 °C for 30 minutes. The negative-positive cut off value was 0.225. The method had no cross-reaction with positive serum of bovine rotavirus, bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial body, bovine infectious rhinotracheitis, bovine parainfluenza virus type 3 and *Escherichia coli*. The intra-and inter-assay coefficient of variation was less than 10%, and the coincident rate with virus neutralization test was 93.5%. The results showed that the positive rate of BCoV antibody was 98.84% in 603 serum samples of cows in some areas of Heilongjiang Province. [Conclusion] The ELISA method established in this study has strong specificity, high sensitivity and good stability, which provides a technical basis for the further development of ELISA kit.

Keywords: Bovine coronavirus, Nucleocapsid protein, ELISA, Epidemiology

牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus),是具有多形性、有囊膜、单股正链的 RNA 病毒^[1]。BCoV 是引起牛呼吸道感染、新生犊牛腹泻和成年牛冬痢的主要病原^[2]。从 1972 年起,BCoV 已被多个国家报道,该病呈世界性分布,不仅影响奶牛产奶性能,而且病愈后的犊牛生长、发育和生产性能都会受到影响。BCoV 主要经由消化道和呼吸道两种途径传播,感染牛会在特定时间排毒来感染牛群^[3]。

BCoV 粒子共有 5 种主要结构蛋白,分别是囊膜蛋白 M、核衣壳蛋白 N、纤突蛋白 S、小膜蛋白 E 和血凝脂酶糖蛋白 HE^[4]。核衣壳蛋白(N)含有

3 个结构域,是一种碱性磷蛋白,具有高度保守性的抗原,在冠状病毒 RNA 合成中发挥作用,多用于 BCoV 的早期诊断^[5]。牛冠状病毒的检测方法有很多,包括透射电子显微镜、间接免疫荧光、血凝试验、RT-PCR 和 RT-qPCR 等,虽然前几种方法可以对 BCoV 进行早期诊断,但费时且成本高昂,对操作人员要求较高,不适于牛场大规模检疫^[6-9]。ELISA 方法操作简便,不需要特殊仪器设备,适合于血清学流行病学调查。本研究前期建立的 ELISA 方法所使用的重组 N 蛋白抗原以包涵体形式表达,通过电洗脱变性条件下纯化得到,其作为 ELISA 抗原存在用量大、敏感性低和亲和力弱等不足。本研究通过对上述方法进行改进,使用经

DNASar 软件预测的免疫原性较好的 N 蛋白抗原表位作为抗原,经基因工程方法获得可溶性重组蛋白,采用镍柱天然条件下纯化得到亲和力较好的活性蛋白,容易与抗体结合,建立的方法敏感性更高、稳定性更好,可进一步装配成稳定的 ELISA 诊断试剂盒,进一步丰富了 BCoV 检测技术,为 BCoV 实验室诊断和流行病学调查提供了技术保障,为防控 BCoV 提供了有效的检测手段。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及阳性血清

BCoV-CD 分离毒株由本实验室分离鉴定及保存^[10];标准阴性血清、标准阳性血清、牛副流感 3 型(BPIV3)、牛轮状病毒(BRV)、牛呼吸道合胞体病毒(BRSV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)、牛病毒性腹泻-粘膜病(BVDV)、大肠杆菌(*E. coli*)阳性血清均由黑龙江八一农垦大学传染病研究室制备保存^[1,11-15]。

1.1.2 主要试剂和仪器

ELISA 板购自 Costar 有限公司;脱脂乳购自 BD 公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自索莱宝公司;TMB 显色液及其它试剂均为国产分析纯。PCR 仪、半干转膜仪、全自动凝胶成像系统和酶标仪均为 Bio-Rad 产品。

1.1.3 引物设计与合成

利用 DNASar 软件对 BCoV-CD 毒株 *n* 基因抗原表位进行预测,使用 Premier 5.0 软件设计 *n* 基因扩增引物,引物两端引入 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切位点,具体序列:F: 5'-GGATCCGATCAGTCCGACC AATCTAG-3'; R: 5'-GTCGACAGGGCTCATCCAT CTTCTTA-3'。

1.1.4 临床检测样本

临床样本是本实验室 2007-2017 年收集并保存的牛血清,具体信息见表 1。

1.2 BCoV 间接 ELISA 抗原的制备

1.2.1 N 蛋白原核表达载体的构建和表达

以 BCoV-CD 分离毒株的 cDNA 为模板,通过 PCR 使用 *n* 基因扩增引物扩增目的片段,PCR 反应

表 1 血清样本来源信息

Table 1 Source information of serum samples

Area	Quantity
哈尔滨 Harbin	30
齐齐哈尔 Qiqihar	90
鸡西 Jixi	50
鹤岗 Hegang	30
双鸭山 Shuangyashan	30
大庆 Daqing	60
伊春 Yichun	71
佳木斯 Jiamusi	62
七台河 Qitaihe	30
牡丹江 Mudanjiang	60
黑河 Heihe	60
绥化 Suihua	30

体系(25 μ L): Quick Taq HS DyeMix (2 \times) 12.5 μ L, 上、下游引物各(12.5 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 2.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。目的片段为 1 241 bp, 构建出 pMD18-T-N 质粒,将阳性质粒与 pET-32a(+)表达载体同时用 *Bam* H I 和 *Sal* I 进行双酶切,凝胶回收基因和线性化的 pET-32a 载体,利用 T4 DNA 酶连接后转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达鉴定。将表达的重组菌超声破碎,300 V 每次超声 10 s,超声 6 次后取裂解的菌液通过 SDS-PAGE 电泳进行可溶性分析。

1.2.2 重组蛋白的鉴定及纯化

以 Anti-His-Tag 单克隆抗体为一抗,对表达的重组蛋白进行 Western blotting 鉴定。按照 CTB His-Binding-resin 镍柱说明书在非变性条件下进行重组蛋白纯化。

1.3 BCoV 间接 ELISA 条件优化

1.3.1 抗原包被条件及样品稀释浓度的优化

包被抗原时,选择 50 mmol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)、50 mmol/L pH 7.6 的 Tris 盐酸缓冲液(TBS)、10 mmol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为包被液,采用 2.5、5.0、7.5 和 10.0 μ g/mL 的抗原浓度包被,选择 37 $^{\circ}$ C 包被(1.0 h 和 2.0 h)、4 $^{\circ}$ C 过夜、37 $^{\circ}$ C 包被(1.0 h 和 2.0 h)后 4 $^{\circ}$ C 过夜等

5 个条件进行包被, BCoV 标准阳性血清、阴性血清按照 1:50、1:100、1:200 进行稀释, 每组做 4 次重复。

1.3.2 二抗及血清反应条件的优化

分别采用 5% 脱脂乳、1% BSA、PBS、1% BSA+5% 犊牛血清、PBST 对标准阳性、阴性血清进行稀释。将 HRP 标记羊抗牛 IgG 按照 1:2 500、1:5 000、1:7 500、1:10 000 的浓度进行稀释。选取 1% 明胶、5% 明胶、5% 脱脂乳、1% BSA、10% 犊牛血清作为封闭液, 每组做 4 次重复。

1.4 阴阳性临界值的确定

采用优化的间接 ELISA 方法对 24 份经病毒中和试验检测过的 BCoV 阴性血清进行检测, 每份血清样品均多次重复检测, 测其 OD_{450} , 通过公式计算阳性和阴性的临界值, 临界值= $X+3SD$, 当待检样品的 $OD_{450}>X+3SD$ 时, 判定为阳性; 当待检样品的 $OD_{450}<X+3SD$ 时, 判定为阴性; 当待检样品的 $OD_{450}=X+3SD$ 时, 判定为可疑^[10]。

1.5 交叉反应、符合率、重复性试验

1.5.1 交叉反应试验

采用优化的间接 ELISA 方法检测对本实验室保存的 BRSV、BRV、IBRV、BPIV3、BVDV 和 *E. coli* 等 6 种阳性血清进行检测, 每个样品进行

4 次重复, 同时设 BCoV 标准阳性血清、阴性血清和空白对照孔, 确定该方法是否存在交叉反应。

1.5.2 符合率试验

利用病毒中和试验^[11]和建立的间接 ELISA 方法对 40 份疑似 BCoV 感染的牛血清样品进行检测。根据 OD_{450} 值判定样品阴阳性, 确定该方法与病毒中和试验的符合率。

1.5.3 重复性试验

随机挑选 5 个样品进行批内和批间重复试验, 计算每份样本的平均值(X)、标准差(SD)和变异系数(CV)。

1.6 黑龙江省 BCoV 血清流行病学调查结果

采用间接 ELISA 方法对 2010–2017 年间黑龙江省不同地区 603 份牛血清进行检测, 调查其血清阳性率。

2 结果与分析

2.1 BCoV N 蛋白原核表达载体的构建和表达

构建的 pMD18-T-N 质粒经 *Sal*I 和 *Bam*H I 双酶切后, 经 1% 凝胶电泳出现 1 241 bp 和 2 692 bp 基因, 与预期目的基因片段大小一致, 见图 1A。重组表达载体质粒 pET-32a-N 用 *Sal*I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定, 结果显示在 1 241 bp 和 5 900 bp

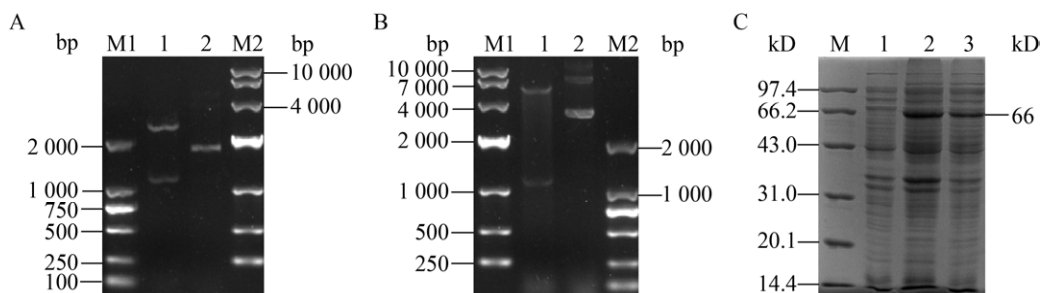


图 1 BCoV N 蛋白的重组表达

Figure 1 Recombinant expression of BCoV N protein

注: A: pMD18-T-N 克隆载体双酶切鉴定; M1: DL2000 DNA Marker; 1: *Bam*H I+*Sal*I 双酶切产物, 2 692 bp/1 241 bp; 2: 重组质粒对照; M2: DL10000 DNA Marker. B: pET-32a-N 表达载体双酶切鉴定; M1: DL10000 DNA Marker; 1: *Bam*H I+*Sal*I 双酶切产物, 5 900 bp/1 241 bp; 2: 重组质粒对照组; M2: DL2000 DNA Marker. C: 重组 N 蛋白 SDS-PAGE 鉴定及可溶性分析; M: 低相对分子质量蛋白 Marker; 1: 未诱导的 pET-32a-N; 2: 沉淀; 3: 上清。

Note: A: Identification of pMD18-T-N Clone Vector by double Enzymatic digestion; M1: DL2000 DNA Marker; 1: *Bam*H I+*Sal*I double digestion product, 2 692 bp/1 241 bp; 2: Plasmid control; M2: DL10000 DNA Marker. B: Identification of pET-32a-N expression vector by double enzymatic digestion; M1: DL10000 DNA Marker; 1: *Bam*H I+*Sal*I double digestion product; 2: Plasmid control; M2: DL2000 DNA Marker. C: Identification and soluble analysis of recombinant N protein by SDS-PAGE; M: Low molecular weight protein marker; 1: Uninduced pET-32a-N; 2: Precipitate; 3: Supernatant.

处出现条带,分别与载体和目的条带大小一致,说明表达质粒构建成功,如图1B所示。对重组菌的菌液上清和菌体沉淀做 SDS-PAGE 凝胶分析,结果菌液上清和沉淀当中都出现了大小约为 66 kD 目的条带,表明该融合蛋白存在可溶性表达,见图 1C。

2.2 重组 BCoV N 蛋白的 Western blotting 鉴定及纯化

Western blotting 结果显示重组菌在约 66 kD 处有特异性免疫印迹,而空载体对照未出现,见图 2A,结果表明 BCoV N 蛋白在大肠杆菌中融合表达。通过镍柱在自然条件下获得了较纯的重组蛋白,咪唑浓度为 200 mmol/L 时洗脱效果最佳,见图 2B。

2.3 BCoV 间接 ELISA 条件优化

2.3.1 抗原包被条件及样品稀释浓度的优化

由图 3A 和 3B 可知选取碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,在 37 °C 包被 1.0 h 时, P/N 值最大,包被效果最好。由图 3C 和 3D 可知,当抗原包被浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最好,样品进行 1:50 稀释时 P/N 值最大,样品稀释效果最佳。

2.3.2 二抗浓度、样本稀释液及封闭条件的优化

由图 4 可知,当 HRP 标记羊抗牛 IgG 稀释度

为 1:7 500,封闭条件为 1%明胶封闭 0.5 h,样本稀释液选择 PBST 时, P/N 值最高, ELISA 反应效果最佳。

2.4 阴阳临界值的确定

24 份 BCoV 阴性血清样品 OD_{450} 平均值为 0.168,标准差为 0.019,根据公式计算阴阳临界值 $X+3SD=0.225$ 。因此待检样品 $OD_{450}>0.225$ 为阳性,待检样品 $OD_{450}<0.225$ 时为阴性,待检样品 $OD_{450}=0.225$ 为可疑。

2.5 交叉反应、重复性、符合率试验

2.5.1 交叉反应试验

采用优化的间接 ELISA 方法对实验室保存的 BCoV、BRV、BRSV、BVDV、IBRV、BPIV3 和 *E. coli* 的阳性血清进行检测,结果表明建立的检测方法方法与 BRV、BRSV、BVDV、IBRV、BPIV3 和 *E. coli* 抗体无交叉反应,特异性良好,见表 2。

2.5.2 重复性试验

随机挑选 5 个样品进行批内和批间重复试验,批内最大的变异系数为 8.97%,批间重复的最大变异系数为 4.24%,均小于 10%,说明建立的检测方法重复性良好,结果见表 3。

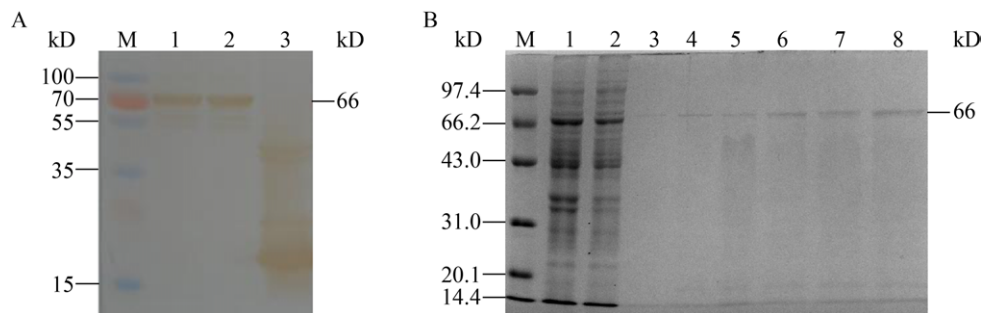


图 2 重组蛋白的鉴定及纯化结果

Figure 2 The results of identification and purification of recombinant protein

注: A: Western blotting 鉴定结果; M: 低相对分子质量蛋白 Marker; 1、2: 诱导的 pET-32a-N 重组菌; 3: pET-32a 空载体对照。B: 重组 N 蛋白纯化结果; M: 低相对分子质量蛋白 Marker; 1: 菌液沉淀; 2: 菌液上清; 3-8: 咪唑浓度分别为 20、50、100、150、200、250 mmol/L。

Note: A: Western blotting identification of recombinant N protein; M: Low molecular weight protein marker; 1, 2: Induced recombinant *E. coli* including pET-32a-N; 3: Negative control. B: Purification of recombinant N protein; M: Low molecular weight protein marker; 1: Precipitate; 2: Supernatant; 3-8: Imidazole concentration of 20 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L, 150 mmol/L, 200 mmol/L, 250 mmol/L.

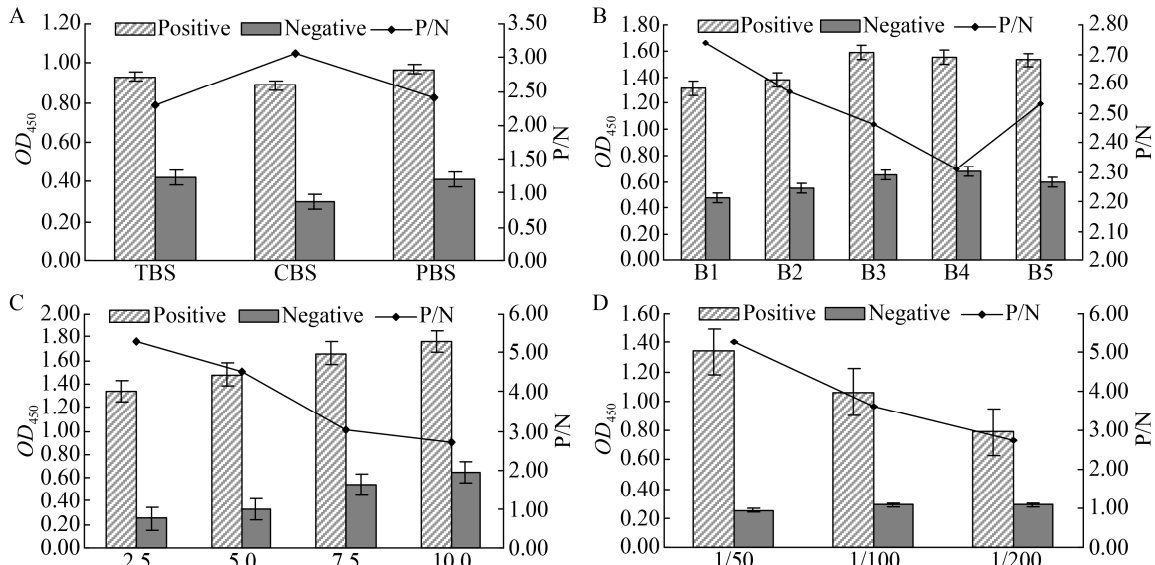


图 3 抗原包被条件及样品稀释浓度的优化结果

Figure 3 The results of optimal conditions of antigen coating and sample dilution concentration

注: A: 包被缓冲液优化; B: 包被条件优化(B1-B5 表示包被条件分别为 37 °C 1 h, 37 °C 2 h, 4 °C 过夜, 37 °C 1 h 4 °C 过夜, 37 °C 2 h 4 °C 过夜); C: 抗原包被浓度优化(μg/mL); D: 样品的稀释浓度优化.

Note: A: Optimization of coating buffer; B: Optimization of coating conditions (B1-B5 indicates that the coating conditions are 37 °C 1 h, 37 °C 2 h, 4 °C overnight, 37 °C 1 h 4 °C overnight, 37 °C 2 h 4 °C overnight); C: Optimization of the antigen coating concentration (μg/mL); D: Optimization of sample dilution concentration.

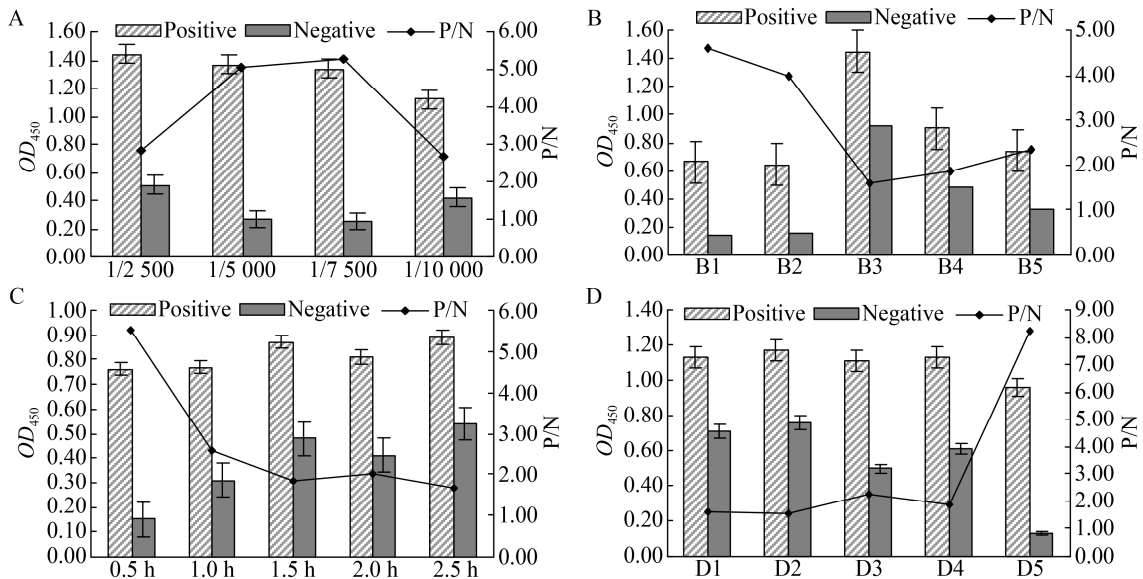


图 4 二抗浓度、封闭条件及样本稀释液的优化结果

Figure 4 Optimization of concentration of horseradish peroxidase labeled second antibody, blocking conditions and sample diluent

注: A: HRP 标记羊抗牛 IgG 稀释度优化; B: 封闭液优化(B1-B5 分别表示包被液种类为 1%明胶、5%明胶、5%脱脂乳、1% BSA、10%犊牛血清); C: 封闭时间优化; D: 样品稀释液的优化(D1-D5 分别表示的稀释液为 5%脱脂乳、1% BSA、PBS、1% BSA+5%血清、PBST).

Note: A: Optimization of dilution of Sheep Anti-Bovine IgG with HRP marker; B: Optimization of the type of blocking solution (B1-B5 indicates that the types of coating solution are 1% gelatin, 5% gelatin, 5% skim milk, 1% BSA, 10% calf serum, respectively); C: Optimization of blocking time optimization; D: Optimization of the type of sample diluent (D1-D5 indicates that the diluents are 5% skim milk, 1% BSA, PBS, 1% BSA and 5% serum, PBST).

2.5.3 符合性试验

应用病毒中和试验和建立的间接 ELISA 方法分别对 40 份疑似 BCoV 感染的牛血清样品进行检测。在病毒中和试验中, 31 份样品被确定为中和抗体阳性; 在间接 ELISA 方法中 29 份样品被确定为阳性, 结果见表 4。

2.6 黑龙江省 BCoV 血清流行病学调查结果

采用优化好的间接 ELISA 方法对黑龙江省 603 份待检血清进行检测, 结果为 596 份阳性血清, 7 份阴性血清, BCoV 的阳性率为 98.84%。各地区的阳性率分别为齐齐哈尔 97.78%, 鸡西 98%, 大庆 98.83%, 牡丹江 96.67%, 绥化 96.67%, 其余地区的阳性率都为 100%。

表 2 间接 ELISA 方法交叉反应试验结果

Table 2 Indirect ELISA method specific test results

Sample	OD ₄₅₀	P/N	Result
BCoV	1.134	5.040	+
BRSV	0.162	0.720	-
BRV	0.153	0.680	-
BPIV3	0.143	0.636	-
BVDV	0.147	0.653	-
IBRV	0.179	0.796	-
<i>E. coli</i>	0.168	0.747	-

Note: +: Positive; -: Negative.

表 3 间接 ELISA 方法重复性试验结果

Table 3 The results of indirect ELISA method repeatability test

Sample	Inter-batch repetition		Intra-batch repetition	
	$\bar{X} + SD$	CV (%)	$\bar{X} + SD$	CV (%)
1	0.427+0.018	4.24	0.398+0.025	6.38
2	0.090+0.004	4.22	0.088+0.008	8.97
3	1.336+0.049	3.64	1.287+0.400	3.10
4	1.193+0.049	4.10	1.168+0.037	3.18
5	1.294+0.031	2.42	1.211+0.054	4.49

表 4 间接 ELISA 方法与病毒中和试验符合性试验结果

Table 4 The coincidence test results of between indirect ELISA method and virus neutralization test

Virus neutralization test	Indirect ELISA method		
	+	-	Total
+	29	2	31
-	0	9	9
Total	29	11	40
Sensitivity (%)	93.5 (29/31)		
Specificity (%)	100 (9/9)		
Coincidence rate (%)	95 (38/40)		

Note: +: Positive; -: Negative.

3 讨论与结论

腹泻是新生犊牛最严重的疾病之一, 腹泻发生率随年龄的增长而下降, 1 月龄以内的犊牛发生腹泻的风险最大。BRV、BCoV、产肠毒素性大肠杆菌(K99)和隐孢子虫等是引起犊牛腹泻的主要病原^[16-18]。BRV 和 BCoV 在世界各国的牛群中广泛传播, 而 BCoV 的发生频率往往高于 BRV^[5,19-20]。对于 BCoV 的检测方法有很多, 但是大多不适合大量样本的快速检测, 而 ELISA 方法可以弥补上述缺陷。

本研究利用当地分离的流行毒株 BCoV-CD 基因组为模板扩增得到 *n* 基因, 通过原核表达获得可溶性蛋白作为 ELISA 抗原, 建立的方法更适合于当前国内 BCoV 感染的流行病学调查。本试验建立的间接 ELISA 方法与常见的牛腹泻病原 BRV、BVDV 和大肠杆菌等阳性血清无交叉反应, 而且与病毒中和试验符合率达到 95%, 说明本方法可以用于临床诊断。采用本试验建立的间接 ELISA 方法, 对 603 份实验室采集并保存的牛血清进行检测, 并完善黑龙江省 BCoV 流行病学调查, 结果表明, BCoV 血清阳性率高达 98.84%, 个别地区阳性率可达 100%。比以前刘合义等检测的阳性率 65.23% 明显升高^[10], 可能由于当前集约化养殖程度提高, 饲养密度加大, 使 BCoV 传染的风险增加^[10,16]。BCoV 感染成年牛导致“冬痢”, 该病传播速度非常快, 在几天内可波及全群或整个地区。最近研究表明, BCoV 能够引起持续感染, 感染牛长期带毒和连续排毒, 造成该病毒在牛群中长期存在^[21]。

本试验建立的间接 ELISA 方法不仅原料易于获得, 而且成本低廉, 所建方法特异性强、敏感性高、稳定性好, 利于装配成检测试剂盒, 更适用于基层单位推广使用。然而该方法还需要通过对大量临床样本的检测和验证来进一步完善, 并组装成快速检测试剂盒, 为我国养牛业健康发展提供技术保障。

REFERENCES

- [1] Gao GQ, Wang MX, Liu MM, et al. Sequence analysis and prokaryotic expression of bovine coronavirus S gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(7): 1740-1749 (in Chinese)
高国强, 王梦心, 刘明明, 等. 牛冠状病毒 S 基因的序列分析及原核表达[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(7): 1740-1749
- [2] Alenius S, Niskanen R, Juntti N, et al. Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1991, 32(2): 163-170
- [3] Lu YD, Liu XX, Chen CF. Prokaryotic expression and identification of bovine coronavirus nucleocapsid protein[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(6): 1154-1165 (in Chinese)
陆亚冬, 刘贤侠, 陈创夫. 牛冠状病毒核衣壳蛋白原核表达及鉴定[J]. *新疆农业科学*, 2018, 55(6): 1154-1165
- [4] Cao Y. Establishment and Application of BRV and BCoV SYBR Green I RT-qPCR Detection method[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018 (in Chinese)
曹禹. BRV 与 BCoV SYBR Green I RT-qPCR 检测方法的建立及应用[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2018
- [5] Nemoto M, Kanno T, Bannai H, et al. Antibody response to equine coronavirus in horses inoculated with a bovine coronavirus vaccine[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(11): 1889-1891
- [6] Gomez DE, Arroyo LG, Poljak Z, et al. Detection of bovine coronavirus in healthy and diarrheic dairy calves[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2017, 31(6): 1884-1891
- [7] Hou PL, Wang HM, He HB. Establishment and application of a multiple RT-PCR for detection of BVDV, BCoV and BEV[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(10): 1672-1675, 1700 (in Chinese)
侯佩莉, 王洪梅, 何洪彬. 牛病毒性腹泻病毒、牛冠状病毒和牛肠道病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(10): 1672-1675, 1700
- [8] Sun LX, Zhu PJ, Li WH, et al. Research development of bovine coronavirus detection methods[J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014(5): 20-22 (in Chinese)
孙留霞, 朱平军, 李文华, 等. 牛冠状病毒检测方法的研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014(5): 20-22
- [9] Shen FY. Development and application of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of bovine coronavirus[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2015 (in Chinese)
沈付烧. 牛冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2015
- [10] Liu HY, Sun LX, Wang JY, et al. Development of an indirect ELISA for the detection of Bovine coronavirus using recombinant N protein[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(8): 618-622 (in Chinese)
刘合义, 孙留霞, 王进轶, 等. 牛冠状病毒重组 N 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(8): 618-622
- [11] Xie JX, Hou XL, Dong HX, et al. The isolation and its genotype identification of neonatal bovine rotavirus[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2010, 22(5): 56-59 (in Chinese)
谢金鑫, 侯喜林, 董华兴, 等. 新生牛轮状病毒的分离及其基因型鉴定[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2010, 22(5): 56-59
- [12] Hou MR, Gao JF, Zhou QM, et al. A summary of the detection techniques for bovine rotaviruses[J]. *China Herbivore Science*, 2013, 33(2): 63-66 (in Chinese)
侯美如, 高俊峰, 周庆民, 等. 牛轮状病毒诊断方法研究进展[J]. *中国草食动物科学*, 2013, 33(2): 63-66
- [13] Zhou YL, Wu HT, Ren YC, et al. Isolation and identification of bovine parainfluenza virus type 3 and the growth and decline antibody titer of the infected dairy cattle[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(1): 23-28 (in Chinese)
周玉龙, 吴海涛, 任亚超, 等. 牛副流感病毒 3 型的分离鉴定及感染牛抗体消长规律的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(1): 23-28
- [14] Zhou YL, Wu DD, Zhou JL, et al. Establishment of multiple PCR detection method of bovine respiratory disease complex[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2016, 28(6): 97-101 (in Chinese)
周玉龙, 吴丹丹, 周金玲, 等. 牛呼吸道综合症多重 PCR 检测方法的建立[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2016, 28(6): 97-101
- [15] Zhang GH, Wu DD, Zhou YL, et al. Isolation and identification of bovine viral diarrhea virus from Heilongjiang province[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(10): 805-807 (in Chinese)
张国华, 吴丹丹, 周玉龙, 等. 牛病毒性腹泻病毒黑龙江分离株的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(10): 805-807
- [16] Hu CW, Jia Z, Jian ZY, et al. Epidemiological investigation of coronavirus in three northeastern provinces[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006(12): 88-89 (in Chinese)
胡传伟, 贾赞, 简中友, 等. 东北三省冠状病毒流行病学调查[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(12): 88-89
- [17] Alkan F, Timurkan MÖ, Karayel I. The molecular characterization and detection of Group A rotavirus from calves with diarrhea in Turkish Republic of Northern

- Cyprus[J]. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2015, 21(1): 127-130
- [18] Lee SH, Vanbik D, Kim HY, et al. Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. in young calves with diarrhea in Korea[J]. Veterinary Parasitology, 2016, 229: 81-89
- [19] Beuttemuller EA, Alfieri AF, Headley SA, et al. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(2): gmr16029580
- [20] Jia WQ, Hu LJ, Meng Y, et al. Molecular epidemiology of bovine rotavirus infections in some areas of Daqing City of Heilongjiang province[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2019, 40(5): 107-108,112 (in Chinese)
- 贾伟强, 胡林杰, 孟野, 等. 黑龙江省大庆市部分地区牛轮状病毒腹泻的分子流行病学调查[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(5): 107-108,112
- [21] Kanno T, Ishihara R, Hatama S, et al. A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2018, 80(7): 1134-1137

(上接 p.271)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>