

马动脉炎病毒 GL 蛋白主要抗原域的表达及间接 ELISA 的初步建立

梁成珠^{1,2}, 曹瑞兵¹, 魏建超¹, 朱来华^{1,2}, 陈溥言^{1*}

(¹ 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(² 青岛出入境检验检疫局 青岛 266002)

摘 要 在分析马动脉炎病毒 GL 蛋白抗原性的基础上,设计一对引物克隆 GL 蛋白一段抗原性较好的抗原域编码基因。将克隆的基因插入 pET-32a 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 之间构建了 GL 蛋白主要抗原域原核表达载体 pET-GL1。将 pET-GL1 质粒转化 *Bl*(21) 宿主菌后,对培养和表达条件进行了优化,实现了 EAV GL 蛋白主要抗原域的高效表达。免疫印迹试验表明获得的表达产物具有良好的反应原性。应用 His·Bind 亲和层析柱纯化重组 EAV-GL1 蛋白,以纯化的重组 GL1 蛋白作为检测抗原,初步建立了检测马动脉炎病毒抗体的 iGL1-ELISA。结果表明,抗原的最佳包被浓度为 9.65 μ g/mL,血清的最佳稀释度为 1:80,阳性标准初步定为:待检血清 $OD_{490} > 0.4$,且待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} > 2$ 。应用 iGL1-ELISA 对马血清样品进行检测,结果表明 iGL1-ELISA 与病毒中和试验的符合率达到 94.1%,与国外同类试剂盒的符合率达到 95.6%。

关键词: 马动脉炎病毒; GL 蛋白; 主要抗原域; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0436-05

马动脉炎病毒(Equine Arteritis Virus, EAV)为套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arteriviridae)成员。1953 年 Doll 等^[1]首次从马流产胎儿中分离出该病毒,并命名为 Bucyrus 株。EAV 是线性单股正链 RNA 病毒,含有 7 个 ORF,编码 4 种结构蛋白:核衣壳蛋白 N、膜蛋白 M、大囊膜糖蛋白 GL 和小囊膜糖蛋白 G_s。大囊膜糖蛋白 GL 含有 EAV 最主要的中和抗原决定簇^[2],是 EAV 的主要保护性抗原,GL 蛋白和 M 蛋白通过二硫键形成二聚体复合物,是病毒颗粒的主要组成单位^[3]。

该病毒为马病毒性动脉炎的病原,引起马的散发性呼吸系统和繁殖系统的接触性传染病,其特征性病变为病变器官小动脉中膜变性和坏死^[4]。在 EAV 流行地区马匹一般呈隐性感染或出现比较轻的感染症状,如果在牧场发生流行可造成妊娠母马的高流产率。持续感染的种公马虽然没有明显的临床症状,但是精液中的病毒可传播给雌马,引起 EAV 的传播^[4]。该病呈世界性分布,血清学试验证实,我国也存在此病^[4]。由于目前还无法区别自然感染产生的抗体和免疫接种产生的抗体,许多国家为了出口的需要,禁止使用疫苗接种来控制本病。

国际兽疫局(OIE)将马病毒性动脉炎列为 B 类传染病。我国农业部宣布其为禁止进境的二类动物传染病,将其作为马属动物在出入境检验检疫工作中的法定检疫项目,检疫条款规定,凡是微量中和试验血清 1:4 结果为阳性的马不准进出口^[4]。目前国际上检测该病方法还有:微量病毒中和试验、荧光抗体检测、血凝抑制试验、ELISA 和荧光定量 PCR 等^[5-8]。但国内到目前还没有检测 EAV 抗体 ELISA 的研究报道,关于 EAV 分子生物学的研究也很少。本研究克隆 EAV GL 蛋白主要抗原域编码基因并进行原核表达,以纯化重组 GL 蛋白为检测抗原建立检测 EAV 抗体的间接 ELISA,从而为我国进出口马匹的马动脉炎检疫研制出一种高效、准确的检测试剂盒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞及载体:马动脉炎病毒 Bucyrus 株、RK-13 细胞、马动脉炎阳性血清、马动脉炎阴性血清和马动脉炎待检血清以及马鼻肺炎阳性血清、马鼻肺炎阴性血清、马传贫阳性血清、马传贫阴性血

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研资助项目(2003-IK-005)

* 通讯作者。Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

作者简介: 梁成珠(1963-),男,山东青岛人,博士生,主要从事动物分子病毒学与动物疫病诊断研究。E-mail: liangcz@163.com

其他作者: 高宏伟²

收稿日期: 2005-09-01; 接受日期: 2006-01-05; 修回日期: 2006-03-04

清由青岛出入境检验检疫局马病检测实验室保存。原核表达载体 pET-32a 质粒和宿主菌 BL21(DE3)由南京农业大学传染病组保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂: M-MLV 反转录酶为 Promega 公司产品, *rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I、DNA Marker 均购自大连 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂盒 Tripure™ Isolation Reagent 购自宝灵曼公司。胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司。DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品, 小牛血清为杭州四季青公司产品。His·Bind® Purification Kit 为 Novagen 公司产品, 羊抗马 HRP-IgG(H + L)为 KPL 公司产品(Catalog No. 14-21-06), EAV 抗体间接 ELISA 检测试剂盒 INGEZIM-ARTERITIS 为西班牙 INGENASA 公司产品。OPD(邻苯二胺)、琼脂糖、IPTG 和 DAB 显色试剂盒购自上海 Sangon 公司, 其它试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

参照 GenBank 上登陆的 EAV Bucyrus 的基因序列(NC-002532), 应用 DNASTAR 软件分析 GL 蛋白的抗原性, 用 Primer 5.0 软件设计一对引物, 目标扩增基因为 EAV GL 蛋白的主要抗原域编码基因, 对应 EAV GP5 163 ~ 294bp。在引物 P1 中加入 *Bam* H I 酶切位点, 引物 P2 中加入 *Xho* I 酶切位点。P1 5'-CGTGGATCC TACA ACTGTTCCGCCAGTAA-3' (*Bam* H I); P2 5'-ATA CTCGAGCGACCAATGCCCTGTTC-3' (*Xho* I)。

1.3 病毒增殖

将保存的 EAV Bucyrus 冻融后离心取上清接种于已长成单层的 RK-13 细胞, 吸附 1h 后用含 2% 血清的 DMEM 维持液于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。48h 后, 当出现 75% 以上细胞病变(CPE)时收获病毒, -80℃ 下保存备用。

1.4 EAV GL 蛋白的主要抗原域编码基因的扩增

取 500 μ L 病毒悬液, 按 Tripure™ 试剂盒的操作说明提取总 RNA。提取的病毒总 RNA 立即用于 RT-PCR。反转录的体系为病毒总 RNA 9.2 μ L, 5 \times Buffer 4 μ L, 10mmol/L dNTP 2 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 0.8 μ L, RNA 酶抑制剂 1.0 μ L 及下游引物 P2 2 μ L。65℃ 反应 15min 后取出, 冰浴条件下加入反转录酶 M-MLV 1.0 μ L, 37℃, 1h, 94℃, 5min 后结束反应, 总体系为 20 μ L。取 5 μ L 反转录产物为 PCR 模板, 按常规体系进行 PCR 扩增, 退火温度为 56℃, 时间为 1min, 共 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收。

1.5 表达载体 pET-GL1 的构建

将回收的目的片段和 pET-32a 质粒分别用 *Bam* H I、*Xho* I 酶切, 用胶回收试剂盒回收纯化的目的产物。将目的片段和载体按 3:1 的摩尔比用 T4 DNA 连接酶进行 4℃ 过夜连接。按文献 [9] 介绍的氯化钙法制备 BL21(DE3)感受态细胞, 并按常规方法转化连接产物。自氨苄(Amp)平板上挑取单菌落, 接种于含 50 μ g/mL Amp 的 LB 培养基, 37℃ 震荡培养 14 ~ 16h, 碱裂解法提取质粒用 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。将阳性质粒命名为 pET-GL1, 送大连 TaKaRa 公司测序。

1.6 阳性转化菌的诱导表达和表达产物的 Western blot 鉴定

将阳性转化菌接种于含 50 μ g/mL Amp 的 LB 培养基 37℃ 震荡培养过夜。次日以 2% 的量接种于 2 \times YT 培养基(50 μ g/mL Amp)震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4 ~ 0.5 时分别加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2mmol/L 的 IPTG 进行诱导培养 4h, 取样进行 SDS-PAGE 分析。分别在 30℃ 和 37℃ 的培养条件下用最佳浓度的 IPTG 进行诱导培养 4h, 取样进行 SDS-PAGE 分析。

将经诱导表达的菌液处理后进行 SDS-PAGE, 按文献 [9] 介绍的方法进行转印及反应, 一抗为抗马动脉炎病毒阳性血清, 二抗为羊抗马 IgG-HRP。显色用 DAB 试剂。

1.7 重组蛋白质 His-Bind 柱纯化

根据 Novagen 公司的 His·Bind® Purification Kit 说明书进行, 取不同时间的洗脱液进行电泳鉴定分析。

1.8 iGL1-ELISA 方阵滴定和检测方法的初步建立

参照文献 [10] 介绍方法进行 iGL1-ELISA 方阵滴定。选取某一 P/N(阳性血清 OD 值/阴性血清 OD 值) 最大且 P 在 1.0 左右的抗原和血清稀释度, 确定抗原最佳包被浓度和抗体适宜稀释倍数。

1.9 iGL1-ELISA 的特异性试验

将马动脉炎阳性血清、马动脉炎阴性血清、血清马鼻肺炎阳性血清、马鼻肺炎阴性血清、马传贫阳性血清、马传贫阴性血清从 1:20 开始做倍比稀释, 每个样品设 3 个重复, 按常规方法利用 iGL1-ELISA 进行检测, 取平均值比较结果。

1.10 iGL1-ELISA 与病毒中和试验比较

取病毒中和试验检测过的 900 份马血清样品, 应用本研究建立的 iGL1-ELISA 进行检测, 对检测结果作比较分析。

1.11 iGL1-ELISA 与进口试剂盒比较

将 180 份待检马血清样品分别用进口的试剂盒 INGEZIM-ARTERITIS 和本研究建立的 iGL1-ELISA 进行检测,对检测结果作比较分析。

2 结果

2.1 目标扩增基因编码蛋白的抗原性分析

应用软件 DNASTar 对 EAV GL 蛋白进行抗原性分析,GL 蛋白 54Aa-98Aa 抗原指数较高,设计引物扩增其编码基因,作为目标表达蛋白。

2.2 目的基因的扩增和表达载体的鉴定

提取 EAV 总 RNA,应用设计的引物 RT-PCR 扩增出大小约为 150bp 的片段,测序结果表明扩增片段为目的基因,编码 EAV GL 蛋白 55 位 Asn 和 97 位 Gly 的密码子 AAT 和 GGA 分别突变为大肠杆菌偏嗜性密码子 AAC 和 GGT。

挑取表达载体转化菌落,LB 震荡培养后提取质粒,应用 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定,电泳结果表明目的片段已成功插入表达载体。

2.3 阳性转化菌的诱导表达及优化

不同浓度的 IPTG 诱导表达产物的 SDS-PAGE 结果表明 0.2 ~ 1.0mmol/L 的 IPTG 均可有效诱导目标蛋白的表达,相比之下 0.8mmol/L IPTG 的诱导效果最佳。表达产物的大小约为 26kDa。不同温度条件下的诱导表达结果(图 1-A)显示,在 30℃ 和 37℃ 条件下目标产物的表达量没有明显的差别,光密度扫描分析表达产物占总菌体蛋白含量分别约为 26.9% 和 28.1%,阳性菌株在两种温度条件下均可高效表达目标产物。

2.4 Western blot 结果

经 Western blot 检测,在目标条带所处的位置(26kDa 左右)出现一条印迹(图 1-B),表明表达产物

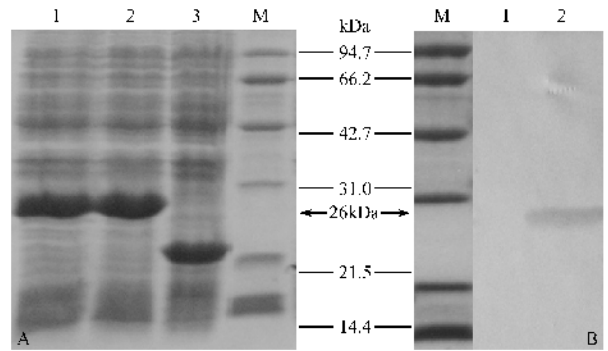


图 1 (A)培养温度对表达的影响 (B)表达产物的免疫印迹分析

Fig.1 (A) Influence of temperature on expression; (B) Analysis of the expressed product by Western blot. A: 1. Expression of *E. coli* harboring pET-GL1 in 30°C; 2. Expression of *E. coli* harboring pET-GL1 in 37°C; 3. Expression of *E. coli* harboring pET-32a in 37°C; B: 1. PET-32a-BL21; 2. PET-GL1-BL21. M. Protein Marker.

具有良好的反应原性。试验中一抗为抗马动脉炎病毒阳性血清,为了消除非特异性反应,先用含空载体 PET32a 的 BL21 发酵菌体的超声波裂解上清处理阳性血清,在进行 Western blot 的反应。

2.5 重组蛋白 EAV-GL1 的纯化

将发酵的菌体进行超声波裂解,收集包涵体,变性液溶解后用 His-bing 层析柱纯化。取不同时间的洗脱样品进行鉴定,目标蛋白仍有较高的浓度,尽管存在极少量的杂蛋白,但目标蛋白占有绝对多的含量,表明纯化效果达到预期的目的。

2.6 iGL1-ELISA 的初步建立

根据抗原抗体的某一稀释孔其 OD_{490} 值为 1.0 左右,且 P/N 最大的原则确定抗原抗体的最佳稀释度。本实验结果(表 1)表明抗原最佳稀释倍数为 1:40,抗体最佳稀释倍数为 1:80。原抗原浓度为 0.386mg/mL,因此,最佳抗原包被浓度为 9.65 μ g/mL。

表 1 EAV 间接 ELISA 方阵滴定结果

Table 1 The result of the indirect ELISA phalanx titrimetry

Ag diluted Tim(X)	Positive serum dilution								Negative serum dilution			
	20	40	80	160	320	640	1280	2460	20	40	80	160
10	2.690	1.791	1.076	0.673	0.382	0.224	0.158	0.064	0.870	0.413	0.291	0.240
20	2.518	1.639	0.979	0.641	0.387	0.233	0.181	0.07	0.539	0.351	0.227	0.197
40	2.896	1.489	1.193	0.754	0.42	0.231	0.171	0.062	0.430	0.288	0.194	0.165
80	2.438	1.083	0.677	0.541	0.305	0.241	0.169	0.068	0.452	0.274	0.182	0.179
160	1.941	0.850	0.553	0.514	0.266	0.235	0.178	0.072	0.083	0.061	0.074	0.066
320	1.700	0.694	0.433	0.391	0.235	0.191	0.162	0.071	0.076	0.065	0.057	0.072
640	1.348	0.517	0.380	0.384	0.207	0.187	0.159	0.088	0.081	0.063	0.052	0.069
1280	1.090	0.500	0.326	0.374	0.202	0.185	0.159	0.082	0.071	0.057	0.067	0.072

The first antibody samples added in line 1 to 8 were different dilutions of standard positive serum of equine arthritis which in the A-D row of the 9 to 12 line were different dilutions of standard negative serum of equine arthritis and those in the E-H row of the 9-12 line was blank control.

2.7 iGL1-ELISA 的特异性试验结果

利用 iGL1-ELISA 检测马动脉炎阳性血清、马动脉炎阴性血清、马鼻肺炎阳性血清、马鼻肺炎阴性血清、马传贫阳性血清、马传贫阴性血清。只有马动脉炎阳性血清样品 OD_{490} 值与马动脉炎阴性血清样品 OD_{490} 值的比值远大于 2, 其余样品的 OD_{490} 值与马动脉炎阴性血清样品 OD_{490} 值的比值均小于 2。因此, 本研究建立的 iGL1-ELISA 具有较好的特异性。

2.8 iGL1-ELISA 与病毒中和试验检测样品的结果

应用 iGL1-ELISA 对病毒中和试验检测过的 900 份马血清样品进行了检测。结果病毒中和试验检测为阳性的 138 份血清, iGL1-ELISA 结果也全为阳性(待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} > 2$); 病毒中和试验检测为阴性的 762 份血清中 iGL1-ELISA 结果为阴性的为 729 份(待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} < 2$), 但有 53 份为阳性(待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} > 2$)。在 900 份马血清样品中, 病毒中和试验检测阳性率为 15.3%, iGL1-ELISA 检测为阳性的样品有 171 份, 阳性率 19%。

iGL1-ELISA 与病毒中和试验进行对比发现, 在 900 份马血清样品中 iGL1-ELISA 与中和试验的结果相符合的样品为 867 份, 两种方法的检测符合率为 94.1%。

iGL1-ELISA 结果为阴性的 729 份马血清的 OD_{490} 的平均值为 0.243 ± 0.067 。因此, 初步确定 iGL1-ELISA 检测结果的阳性标准: 待检血清 $OD_{490} > 0.4$, 且待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} > 2$ 。

2.9 iGL1-ELISA 与 INGEZIM-ARTERITIS 比较试验结果

分别用本研究建立的 iGL1-ELISA 和进口的检测马病毒性动脉炎抗体 INGEZIM-ARTERITIS 试剂盒对 180 份待检血清进行了检测。结果均为阳性的样品有 28 份, 均为阴性的样品有 144 份, 应用 INGEZIM-ARTERITIS 检测为阳性, 而 iGL1-ELISA 检测为阴性的样品有 3 份, 应用 INGEZIM-ARTERITIS 检测为阴性, 而 iGL1-ELISA 检测为阳性的样品有 5 份。iGL1-ELISA 检测结果的阳性率为 18.3%, INGEZIM-ARTERITIS 试剂盒检测结果的阳性率 17.2%。本研究制备的 iGL1-ELISA 试剂盒与 INGENASA 公司的 INGEZIM-ARTERITIS 试剂盒的检测符合率为 95.6%。

3 讨论

马病毒性动脉炎引起马的繁殖障碍和呼吸系统疾病, 并严重影响赛马的质量。近年来, 随着赛马的国际化交流日益增多, 该病的传播速度和传播范围也在不断加快和扩大, 1996 年我国从吉尔吉斯进口的 6 匹赛马, 检疫结果其中 5 匹马的血清 EAV 抗体阳性, 从新疆地区出口韩国的 116 匹马也检出 1 匹血清 EAV 抗体阳性^[5]。

山东检验检疫局的马病重点实验室承担全国出入境马属动物的检验检疫工作, 马病毒性动脉炎是重点检测项目, 每年检测的血清样品在 500 头份左右^[5]。长期以来, 对出入境马属动物的 EAV 检测只有用中和试验(Neutralization test, NT), NT 固然准确, 但需时过长, 要求条件高, 因此, 在实际工作中, 非常需要一种快捷有效的检测方法, 这对我们检验检疫人员提高工作效率具有重要的现实意义。

Balasuriya 等^[11]研究发现 EAV 的中和抗体表位主要位于大囊膜蛋白 GL 上, Hedges 等^[12]研究发现作为状病毒表达的 GL 蛋白可作为包被抗原来检测 EAV 抗体。国际上也规定, 凡是微量中和试验血清 1:4 结果为阳性的马匹不准进出口。本研究在应用蛋白质分析软件对 EAV GL 蛋白进行抗原性分析的基础上, 运用 RT-PCR 技术从 EAV Bucyrus 株的基因组中克隆了 EAV GL 蛋白主要抗原域编码基因, 并成功地在 大肠杆菌中高效表达, 免疫印迹试验表明表达产物具有良好的反应原性。

在成功表达马动脉炎病毒 GL 蛋白主要抗原域基础上, 本研究以纯化蛋白作为包被抗原初步建立了检测马病毒性动脉炎抗体的间接 ELISA 方法, 确定了最佳抗原包被浓度为 $9.65 \mu\text{g}/\text{mL}$, 抗体最佳稀释倍数为 1:80。阳性标准初步定为: 待检血清 $OD_{490} > 0.4$, 且待检血清 OD_{490} /阴性血清 $OD_{490} > 2$ 。应用本研究建立的 iGL-ELISA 与从西班牙进口 INGEZIM-ARTERITIS 试剂盒对 180 份待检血清进行了对比实验, 结果两种试剂盒的检测符合率为 95.6%。应用 iGL-ELISA 与病毒中和试验对 900 份样品的检测结果表明, 两者的检测符合率为 94.1% 表明本研究建立的检测马动脉炎抗体的 iGL-ELISA 可应用于马匹个体的马动脉炎抗体检测。

在我国部分地区一些马群中存在马病毒性动脉炎血清学阳性马匹, 但尚未分离到该病毒。为了维护我国对外贸易的信誉, 防止疫病传播, 避免造成更大的损失, 应加强进出口马匹的检疫。

参 考 文 献

- [1] Snijder EJ, Meuleberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, 1998, **79**: 961 - 979.
- [2] Chimside ED, de Vries AA, Mumford JA, *et al.* Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL. *J Gen Virol*, 1995, **76**(8): 1989 - 1998.
- [3] De Vries AA, Post SM, Raamsman MJ, *et al.* The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol*, 1995, **69**(8): 4668 - 4674.
- [4] 梁成珠. 马病毒性动脉炎. 中国进出境动植物检, 1996, **1**: 40 - 42.
- [5] 梁成珠, 陈忠国, 孟广校, 等. 马病毒性动脉炎微量中和试验研究与应用. 中国兽医科技, 1996, **26**(9): 13 - 14.
- [6] 朱来华, 梁成珠, 李保家, 等. 马病毒性动脉炎血凝及血凝抑制试验研究与应用. 中国兽医科技, 2001, **31**(12): 32 - 34.
- [7] 朱来华, 梁成珠, 李保家, 等. 马动脉炎病毒血凝抑制试验与微量中和试验的对比研究. 中国兽医杂志, 2003, **39**(2): 15 - 17.
- [8] 梁成珠, 杨松, 高宏伟, 等. 实时定量 RT-PCR 检测马动脉炎病毒. 中国兽医学报, 2005, **25**(3): 141 - 144.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] 郑其升, 张晓勇, 刘华雷, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素基因的原核表达及间接 ELISA 方法的初步建立. 微生物学报, 2005, **45**(1): 58 - 61.
- [11] Balasuriya UB, Dobbe JC, Heidner HW, *et al.* Characterization of the neutralization determinants of equine arteritis virus using recombinant chimeric viruses and site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Virology*, 2004, **321**(2): 235 - 246.
- [12] Hedges JF, Balasuriya UB, Ahmad S, *et al.* Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbant assays utilizing GL, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. *J Virol Methods*, 1998, **76**(1 - 2): 127 - 137.

Prokaryotic expression of the major antigenic domain of equine arteritis virus GL protein and the establishment of putative indirect ELISA assay

LIANG Cheng-zhu^{1, 2}, CAO Rui-bing¹, WEI Jian-chao¹, ZHU Lai-hua^{1, 2}, CHEN Pu-yan^{1*}

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Qingdao Entry/Exit Inspection and Quarantine bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract According to the antigenic analysis of equine arteritis virus (EAV) GL protein, one pair of primers were designed, with which the gene fragment coding the high antigenic domain of EAV GL protein was amplified from the EAV genome. The cloned gene was digested with BamH I and Xho I and then inserted into pET-32a and resulted pET-GL1. The pET-GL1 was transformed into the host cell BL21(DE3) and the expression was optimized including cultivation temperature and concentration of IPTG. The aim protein was highly expressed and the obtained recombinant protein manifested well reactionogenicity as was confirmed by Western blot. The recombinant GL1 protein was purified by the means of His·Bind resin protein purification procedure. Then an indirect ELISA was established to detect antibody against EAV with the purified GL1 protein as the coating antigen. The result showed that the optimal concentration of coated antigen was 9.65 μ g/mL and the optimal dilution of serum was 1:80. The positive criterion of this ELISA assay is OD_{the tested serum} > 0.4 and OD_{the tested serum}/OD_{the negative serum} > 2.0. The iGL-ELISA was evaluated versus micro-virus neutralization test. The ELISA was performed on 900 sera from which were preserved by this lab during horse entry/exit inspection, the agreement (94.1%) of these test were considered suitable for individual serological detection. In another test which 180 sera samples were detected by iGL-ELISA and INGEZIM ELISA kit respectively. The agreement ratio between the two methods is 95.6%.

Keywords : Equine arteritis virus ; GL protein ; Major antigenic domain ; Prokaryotic expression ; Indirect ELISA