

牛流行热病毒 G₁ 抗原表位基因在大肠杆菌中的表达、纯化及抗原性鉴定

郑福英 蔺国珍 邱昌庆*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室 兰州 730046)

摘 要 : 从包含牛流行热病毒 G 蛋白基因的质粒 pMD-G 中克隆 G₁ 抗原表位区基因 , 与表达载体 pGEX-4T-1 连接 , 成功构建重组质粒 pGEX-G₁。重组质粒转化 BL21(DE3) , 以 IPTG 进行诱导 , 并确定了最佳表达条件的 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L、反应温度为 16℃、诱导时间为 18h。可溶性表达的目的蛋白经 Glutathione Sepharose TM^{4B} 介质纯化 , 纯度达 80% ; 以包涵体形式存在的重组蛋白以 2% 的脱氧胆酸钠洗涤、0.5% 的 N-十二烷基肌氨酸钠溶解、透析复性、Glutathione Sepharose TM^{4B} 纯化后 , 纯度达 85% 以上。Western blot 试验表明纯化的目的蛋白有良好的反应原性。经间接 ELISA 检测 , 测得牛流行热病毒 12 份阳性血清的 OD₄₉₀ 值平均为 1.813 ± 0.231 , 12 份阴性血清的 OD₄₉₀ 值平均为 0.359 ± 0.032 , 差异极显著 (*P* < 0.01)。将重组蛋白作为抗原免疫兔子 , 试验兔均产生了高滴度的抗体 , 证实该蛋白有免疫原性。将目的蛋白作为包被抗原 , 测得 8 份狂犬病病毒阳性血清的 OD₄₉₀ 值平均为 0.324 ± 0.031 , 与所测 12 份阴性血清的 OD₄₉₀ 值接近 , 说明不存在交叉反应。以上结果均证实纯化后的重组蛋白有良好的生物学活性和特异性 , 可作为包被抗原 , 开发 ELISA 试剂盒。

关键词 : 牛流行热病毒 ; G₁ 抗原表位基因 ; 大肠杆菌 ; 表达 ; 鉴定

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209 (2007) 03-0498-05

牛流行热(BEF)是由牛流行热病毒(BEFV)引起的一种急性传染病。该病传播迅速 , 流行面广 , 有一定的周期性 , 曾在我国多个省份多次发生 , 给养牛业造成重大经济损失^[1~3]。

牛流行热病毒(BEFV)有 5 种结构蛋白 , 其中 G 蛋白是主要的免疫原性蛋白。G 蛋白表面存在 5 个抗原位点(G₁、G₂、G_{3a}、G_{3b}、G₄) , G₁ 为 BEFV 所特有 , 只与牛流行热阳性血清发生反应 , 而其它位点与同科的相关病毒则存在交叉反应^[4~6] , 因此我们选取该抗原表位基因进行克隆表达和纯化。经鉴定 , 所得的纯化表达蛋白具有良好的生物学活性和特异性 , 可以作为包被抗原 , 建立检测 BEF 血清抗体的特异性 ELISA 方法 , 为开发相关的试剂盒奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、血清及质粒 : 新西兰白兔购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物场。牛流行热阴性和阳性血清、牛流行热灭活苗为哈尔滨兽医

研究所原魁章研究员提供。pMD-G 克隆质粒为前期工作构建。JM109、BL21(DE3)、pGEX-4T-1、狂犬病病毒阳性血清(来自犬) 本实验室保存。

1.1.2 试剂 : Glutathione Sepharose TM^{4B} 购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司。pMD18-T、质粒提取试剂盒、Ex 预混酶、*Bam*H I、*Xho* I , 均购自宝生物工程(大连) 有限公司。X-gal、IPTG、氨苄青霉素钠、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等 , 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。兔抗犬 HRP-IgG(H + L)、兔抗牛 HRP-IgG(H + L) 为北京博大泰克生物基因技术有限责任公司产品。DAB 美国 AMRESCO 公司进口。其它常规试剂均为国内生产。

1.2 G₁ 抗原表位基因的克隆

将所测牛流行热病毒(JB76H 株) G 蛋白基因序列与 NCBI/GenBank 上登载的多个台湾株、澳大利亚株的 G 基因序列用 DNASTar 软件进行、同源性比较 , 在其最保守区域设计 G₁ 抗原位点区表达引物。上、下游引物之间扩增片段为 420bp。上游引物 : 5'-GGATCC AGAGCTTGGTGTGAATAC -3(*Bam*HI) ; 下游引

基金项目 国家奶业重大专项基金资助(2002BA518A04)

* 通讯作者。Tel 86-931-8342673 E-mail : zqiu@126.com

作者简介 郑福英(1974 -) , 女 , 山东济宁人 , 博士 , 主要从事动物传染病病原分子诊断与免疫研究。E-mail : zfycaas@126.com

收稿日期 2006-09-04 接受日期 2006-11-29 修回日期 2006-12-15

物 5'-CTCGAGCCAACCTACAACAGCAGATA-3'(XhoI)。

以 pMD-G 质粒为模板,50 μ L 体系扩增 G₁ 抗原表位基因。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 40s,49 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 40s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增所得片段与 pMD18-T 载体连接,通过 PCR 扩增、双酶切鉴定、测序等筛选阳性克隆质粒,命名为 pMD-G₁。

1.3 表达载体的构建

以 40 μ L 体系、BamH I 和 Xho I 分别双酶切 pMD-G₁ 质粒、pGEX-4T-1 载体,琼脂糖凝胶回收目的片段。10 μ L 连接体系 16 $^{\circ}$ C 连接 48h,转化 JM109,筛选、鉴定阳性表达质粒,命名为 pGEX-G₁。

1.4 重组载体在 BL21 中的表达

pGEX-G₁ 转化表达菌 BL21(DE3),挑取单克隆菌株,接种 5mL LB(含 Amp 100 μ g/mL)培养基,37 $^{\circ}$ C、230r/min 培养过夜,取 0.02mL 培养物接种 20mL LB 培养基,平行做 7 份,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~1.0,分别以终浓度 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mmol/L IPTG,16 $^{\circ}$ C 低温诱导表达 18h。SDS-PAGE 鉴定表达量最大时的 IPTG 浓度,并以最佳 IPTG 浓度 16 $^{\circ}$ C 诱导 1000mL 菌液。同时空载体 pGEX-4T-1 转化 BL21(DE3),挑取单克隆菌株进行诱导,培养菌液作为阴性对照。

1.5 重组蛋白的纯化

把 1000mL 菌液 5000r/min 离心 10min,菌体沉淀用 PBS 洗涤一次,离心收集菌体,并秤量菌体湿重克(g)数。按每克菌重加入 5mL 菌体裂解液(137mmol/L NaCl,2.7mmol/L KCl,10mmol/L Na₂HPO₄,2mmol/L KH₂PO₄,1mmol/L EDTA,pH 8.0)悬浮,加入溶菌酶至终浓度 100 μ g/mL,混匀冰浴 15min 后,在冰浴中超声破碎菌体。完全裂解后的菌液 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 15min,分别收集上清和沉淀。

用 Glutathione Sepharose TM^{4B} 介质以离心方法纯化上清中的目的蛋白和 GST 载体蛋白^[7],并将纯化蛋白样品加入蛋白浓缩管浓缩至 0.5~2mL,所得样品分别标记为 1、3 号蛋白。

将沉淀悬浮于 9 倍体积的包涵体洗涤液(50mmol/L Tris,100mmol/L NaCl,10mmol/L EDTA,0.5% Triton X-100,2% DOC,pH 8.0)中,室温静置 20min,然后 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 15min,弃去上清,重复洗涤 3 次。加入包涵体溶解液(50mmol/L Tris,100mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,1mmol/L DTT,0.5% SKL,pH 8.0)直至沉淀完全溶解。稀释蛋白浓度约 0.1mg/mL,装入透析袋内,置于复性液(50mmol/L

Tris,100mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,0.1mmol/L GSSG,1mmol/L GSH,pH 8.0)中,4 $^{\circ}$ C 透析复性。每 12h 更换透析液,共透析 48h。透析完毕后,将透析袋包埋于 PEG6000 干粉中,浓缩至袋内液体约 10mL,转移至离心管中,12000r/min 离心 20min,取上清,用 0.45 μ m 滤膜过滤,再与 Glutathione Sepharose TM^{4B} 介质结合进一步纯化(步骤同菌体裂解上清),所得样品标记为 2 号蛋白。测定 1、2、3 号蛋白样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,计算其浓度和纯度。

1.6 重组蛋白的活性鉴定

将 1、2、3 号蛋白取样进行 SDS-PAGE 分析,转印至硝酸纤维素滤膜,进行 Western blot 分析。

以方阵法确定最适抗原包被量,血清和酶标二抗的最佳稀释度,目的蛋白作为包被抗原,按常规间接 ELISA 方法检测 12 份 BEFV 阳性血清和 12 份阴性血清(经病毒中和试验鉴定)的 OD₄₉₀ 值,并计算其平均值。同时以 GST 载体蛋白包被酶标板检测上述血清样品,作为阴性对照。

将纯化的目的蛋白与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈部皮下免疫 5 只体重 2.5 公斤健康新西兰白兔,接种抗原量 200 μ g/只,2 周后同等剂量蛋白(与等体积弗氏不完全佐剂混合)加强免疫一次。同时以牛流行热灭活苗免疫 5 只试验兔,1mL/只,间隔 2 周再免一次。第二次免疫后 1 周、2 周、3 周分别耳静脉采血分离血清,间接 ELISA 法检测抗体效价。

1.7 间接 ELISA 特异性试验

以纯化的目的蛋白作为包被抗原,检测 8 份狂犬病病毒(RV)与 BEFV 同属弹状病毒科的阳性血清,验证是否有交叉反应。

2 结果

2.1 表达载体的构建

重组质粒 pGEX-G₁ 经 PCR 扩增和双酶切鉴定,均获得长度约 420bp 的基因片段,经测序分析,目的基因为 420bp,与预期结果完全一致,成功构建了表达载体。

2.2 重组菌株的诱导表达

以不同浓度 IPTG 在 16 $^{\circ}$ C 低温诱导 18h,经 SDS-PAGE 分析,重组菌均表达了约 41.54kDa 的目的蛋白,与预期大小一致(包括 26.0kDa 的载体蛋白和 15.54kDa 的序列推导蛋白),随着 IPTG 浓度增加,表达的目的蛋白量逐渐降低,以 0.1mmol/L 终浓度诱导时表达量最大,经薄层扫描分析,目的蛋白约占菌体总蛋白量的 40%(图 1)。

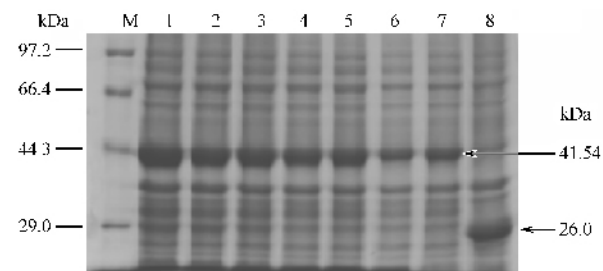


图1 不同浓度 IPTG 诱导的 BL21/pGEX-G₁ 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression products of BL21/pGEX-G₁ induced with IPTG in different concentration. M. Low molecular weight protein Marker ; 1 ~ 7. Expression products of BL21/pGEX-G₁ induced with IPTG (concentration was 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7mmol/L respectively) ; 8.Expression products of BL21/pGEX-4T-1 induced with IPTG.

2.3 重组蛋白的纯化

上清中的目的蛋白经 Glutathione Sepharose TM^{4B} 介质纯化后,测定其样品的 OD_{280}/OD_{260} 值为 1.58 ,纯度达到 80% ,蛋白浓度为 3.822mg/mL ,共得到 3.058mg 纯化蛋白。包涵体经变性、复性、Glutathione Sepharose TM^{4B} 纯化后,测定其样品的 OD_{280}/OD_{260} 值为 1.67 ,纯度达 85% 以上 ,蛋白浓度 1.735mg/mL ,共得到 1.215mg 纯化的蛋白 ,为上清中目的蛋白回收量的 39.7 %。GST 载体蛋白纯化样品的 OD_{280}/OD_{260}

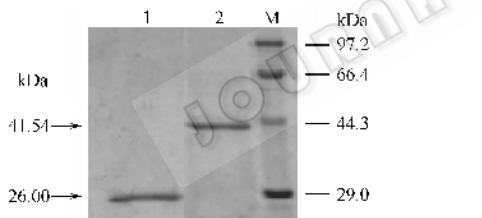


图2 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS -PAGE analysis of the protein purified. M. Low molecular weight protein marker ; 1. GST protein purified ; 2. Target protein purified.

值为 1.75 ,纯度达到 90% 以上 ,蛋白浓度为 4.627mg/mL ,共得到 5.552mg 纯化蛋白(图 2)。

2.4 重组蛋白的生物学活性鉴定

经 Western blot 分析 ,纯化后的目的蛋白能与牛流行热阳性血清结合 ,出现了明显的显色带 ,而纯化后的 GST 载体蛋白未出现显色带(图 3)。

经方阵法确定最适抗原包被量为 9.56μg/孔 ,血清和酶标二抗的最佳稀释度分别为 1:80 和 1:800。将目的蛋白包被酶标板 ,间接 ELISA 方法测得 BEFV 12 份阳性血清的 OD_{490} 值平均为 1.813 ± 0.231 ,12 份阴性血清的 OD_{490} 值平均为 0.359 ± 0.032 (表 1) , $P < 0.01$,差异极显著。以纯化的 GST 载体蛋白作为包被抗原检测以上阳性、阴性血清 , OD_{490} 值平均分别为 0.521 ± 0.054 、 0.259 ± 0.035 (表 2)。

兔体免疫试验结果表明 ,牛流行热灭活苗组免疫后第 1、2、3 周采集的血清样品 ,经间接 ELISA 测得的 OD_{490} 值平均分别为 0.901 ± 0.104 、 1.698 ± 0.159 、 2.223 ± 0.285 ,重组蛋白免疫组血清样品测得的 OD_{490} 值平均分别为 0.776 ± 0.097 、 1.323 ± 0.153 、 1.812 ± 0.247 。

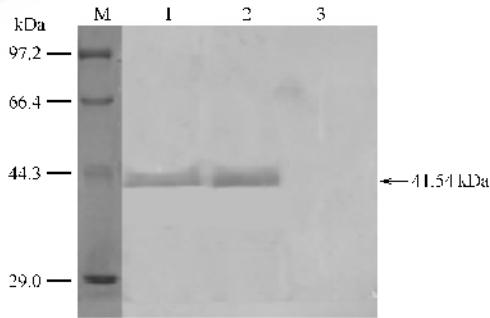


图3 纯化蛋白的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of the protein purified. M. Low molecular weight protein Marker ; 1 ~ 2. Target protein purified ; 3. GST protein purified.

表 1 目的蛋白抗原间接 ELISA 检测 BEFV 阴、阳性血清结果

| Table 1 The result of indirect ELISA detecting negative and positive sera to BEFV with target protein | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|
| Sample | Value of OD_{490} | | | | | | | | | | | | Average of OD_{490} |
| Positive sera | 1.857 | 2.212 | 1.877 | 1.844 | 1.870 | 1.869 | 2.039 | 1.902 | 1.697 | 1.287 | 1.580 | 1.716 | 1.813 ± 0.231 |
| Negative sera | 0.353 | 0.435 | 0.364 | 0.330 | 0.340 | 0.365 | 0.397 | 0.350 | 0.338 | 0.329 | 0.382 | 0.327 | 0.359 ± 0.032 |

表 2 GST 载体蛋白抗原间接 ELISA 检测 BEFV 阴、阳性血清结果

| Table 2 The result of indirect ELISA detectin negative and positive sera to BEFV with GST protein | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|
| Sample | Value of OD_{490} | | | | | | | | | | | | Average of OD_{490} |
| Positive sera | 0.510 | 0.593 | 0.561 | 0.527 | 0.461 | 0.573 | 0.590 | 0.560 | 0.490 | 0.444 | 0.456 | 0.488 | 0.521 ± 0.054 |
| Average of OD_{490} | 0.228 | 0.340 | 0.286 | 0.252 | 0.244 | 0.253 | 0.275 | 0.273 | 0.226 | 0.221 | 0.284 | 0.227 | 0.259 ± 0.035 |

2.5 特异性试验

目的蛋白作为包被抗原,测得 8 份 RV 阳性血清的 OD₄₉₀ 值平均为 0.324 ± 0.031(表 3),与所测 12

份阴性血清的 OD₄₉₀ 值(平均为 0.359 ± 0.032)接近,说明不存在交叉反应。

表 3 间接 ELISA 特异性结果

| Table 3 The result of indirect ELISA for specificity | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
| Anti-RV sera | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Average of OD ₄₉₀ |
| Value of OD ₄₉₀ | 0.339 | 0.305 | 0.365 | 0.313 | 0.275 | 0.299 | 0.342 | 0.352 | 0.324 ± 0.031 |

3 讨论

本研究的目的是表达 BEFV 的特异性蛋白,这种蛋白要能与 BEFV 阳性血清特异性结合,并且与其它病毒的抗血清无交叉反应,据此该蛋白可以作为包被抗原,建立检测血清抗体的 ELISA 方法,开发 ELISA 试剂盒,跟踪检测疫苗免疫后的抗体消长规律和发病前后的抗体水平。G₁ 抗原表位为 BEFV 所特有,因此我们选取该抗原表位基因进行克隆表达。本文选择克隆的 G₁ 抗原区基因片段为 420bp,编码 140 个氨基酸,在 G 基因中的氨基酸序列位置为 390 ~ 529 位,包括了完整的 G₁ 基因区。

将克隆化基因导入大肠杆菌往往可以获得高水平表达的外源蛋白,但相当多的蛋白以没有活性的包涵体形式存在,所以必须经过复性。现有的证据表明,包涵体的形成是因为部分折叠或错误折叠的蛋白发生不适当聚集,而不是由天然蛋白的不溶性或不稳定性所致^[8]。如果表达的蛋白折叠成对热不稳定的中间体,就会促进包涵体的形成,如果在低温培养高水平表达外源蛋白的大肠杆菌,就能在一定程度上抑制包涵体的形成^[9~11]。

本试验将重组菌以 0.1mmol/L IPTG 终浓度、37℃诱导 4h 后收集菌体,超声破碎后 SDS-PAGE 分析上清和沉淀,发现上清中没有可溶性蛋白,目的蛋白几乎都以包涵体形式存在;将诱导温度降到 16℃,培养 18h,上清中观察到目的带,但量很低,约占表达的目的蛋白总量的 20% 左右,其余仍以包涵体形式存在。1L 培养菌液中的可溶性蛋白经 Glutathione Sepharose TM^{4B} 纯化后得到 3.058mg,而包涵体经过变性、复性、Glutathione Sepharose TM^{4B} 纯化后只得到 1.215mg,为上清中目的蛋白回收量的 39.7%,说明复性率很低,具体原因和提高复性率的措施仍在研究中。纯化蛋白的纯度均达到 80% 以上,完全可以满足后续实验要求。

纯化后的重组蛋白经 Western blot 分析,结果表明该蛋白能被 BEFV 阳性血清识别,作为包被抗原

检测经中和试验鉴定的 BEFV 阳性血清,其 OD₄₉₀ 值平均为 1.813 ± 0.231;以纯化的 GST 载体蛋白作为包被抗原检测 BEFV 阳性血清的 OD₄₉₀ 值平均为 0.521 ± 0.054,经统计学分析, $P < 0.01$,差异极显著,说明所表达的目的蛋白有良好的反应原性和特异性,载体蛋白与阳性抗体的结合很弱,可排除因此引起的假阳性反应。兔体免疫实验说明该蛋白能刺激机体产生抗体,有免疫原性。以上结果均证明所表达的蛋白有良好的生物学活性。

与牛流行热病毒相关的 Berrimah、Kimberley 病毒等在国内未见报道,已报道的国内存在并感染牛的弹状病毒只有 BEFV 和 RV。用表达的重组蛋白作为包被抗原,间接 ELISA 方法检测 BEFV 阳性血清,OD₄₉₀ 值平均为 1.813 ± 0.231;检测 RV 阳性血清,OD₄₉₀ 值平均为 0.324 ± 0.031(与检测 BEFV 阴性血清测得的 OD₄₉₀ 值 0.359 ± 0.032 接近),经统计学分析, $P < 0.01$,差异极显著,说明无交叉反应,表现出良好的特异性。所以该重组蛋白可以作为包被抗原,建立检测 BEFV 血清抗体的 ELISA 方法,开发 ELISA 试剂盒。

参 考 文 献

[1] Walker PJ. Bovine ephemeral fever in Australia and the world. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2005, **292**: 57 – 80.

[2] Hsieh YC, Chen SH, Chou CC, *et al.* Bovine ephemeral fever in Taiwan (2001—2002). *Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, **67**(4): 411 – 416.

[3] Yeruham I, Sharir B, Yadin H, *et al.* Bovine ephemeral fever in beef cattle herds in the Jordan Valley, Israel. *Veterinary Record*, 2003, **152**(3): 86 – 88.

[4] Hsieh YC, Wang SY, Lee YF, *et al.* DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovine ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2006, **68**(6): 543 – 548.

[5] Kongsuwan K, Cybinski DH, Cooper J, *et al.* Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *Journal of General Virology*, 1998, **79**(Pt11): 2573

- [6] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Girish KR, Palanivelu S, Kumar PD, *et al.* Refolding, purification and characterization of replication-initiator protein from soybean-infecting geminivirus. *Journal of Virological Methods*, 2006, **136**(1-2): 154-159.
- [9] Marzena P, Jacek L. Expression and purification of recombinant human α -defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2006, **49**(1): 1-8.
- [10] Santa RJ, Takanori K, Narandalai DS, *et al.* Purification and characterization of the second Streptomyces phospholipase A2 refolded from an inclusion body. *Protein Expression and Purification*, 2006, **50**(1): 82-88.
- [11] Debyshire V, Astatke M, Joyce CM. Re-engineering of overproduction and purification strategies. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**: 5439-5448.

Expression, purification and antigenic characterization of the Epitope-G₁ gene of Bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*

ZHENG Fu-ying, LIN Guo-zhen, QIU Chang-qing*

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract :The epitope-G₁ gene, cloned from the pMD-G plasmid including G protein gene of bovine ephemeral fever virus (BEFV), was subcloned into expression vector pGEX-4T-1 to construct pGEX-G₁ recombinant plasmid successfully. The pGEX-G₁ was transformed into *E. coli* BL21(DE3) to be induced with IPTG. The optimal expression conditions for G₁ gene were obtained, which included reaction temperature 16°C, induction time 18h and IPTG concentration 0.1mmol/L. The soluble target protein was purified with Glutathione Sepharose TM^{4B} and the purity reached 80%. The inclusion body washed with 2% deoxycholic acid sodium salt and dissolved with 0.5% N-lauroyl sarcosine sodium was recovered by the way of dialysis, then the protein was purified with Glutathione Sepharose TM^{4B} and its purity was above 85%. The protein purified had nicer reaction activity by analysis of Western blot. The target protein was used as coating antigen to detect the sera against BEFV by an indirect ELISA. The 12 positive sera to BEFV were detected and the average of OD₄₉₀ was 1.813 ± 0.231, while the average of OD₄₉₀ from 12 negative sera was 0.359 ± 0.032, and the distinction was very remarkable ($P < 0.01$). All the rabbits inoculated with the target protein had produced high titer of antibodies, which indicated that the target protein had immunological activity. The average of OD₄₉₀ detecting the 8 positive sera to rabies virus (RV) with the target protein purified was 0.324 ± 0.031 which closed the datum obtained from the negative sera to BEFV, and it showed no cross-reaction between the sera to RV and BEFV. All the results above indicated that the target protein expressed had nicer biological activity and specificity, so the protein could be used as coating antigen to develop ELISA Kit for diagnosing BEF.

Keywords : bovine ephemeral fever virus; epitope-G₁ gene; *Escherichia coli*; expression; characterization