

猪流行性腹泻病毒 N 重组表达蛋白 间接 ELISA 检测方法建立

顾 昀^{1,2},周晓丽²,袁秀芳²,杜晓莉²,徐丽华²,李军星²,方维焕¹,王一成²

(1. 浙江大学,浙江 杭州 310027;2. 浙江省农业科学院 畜牧兽医研究所,浙江 杭州 310021)

摘要:为了检测猪血清中猪流行性腹泻病毒抗体水平,用纯化的猪流行性腹泻病毒 N 基因重组表达蛋白作为包被抗原,建立了检测猪流行性腹泻病毒抗体的间接 ELISA 方法。ELISA 的最佳工作条件是:抗原包被浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,包被时间 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,5% 脱脂乳的 PBS 封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。血清稀释度为 1:100;37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 45 min,辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 稀释度为 1:10 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min,底物显色 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。抗体临界值为 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.30$ 判为阳性, $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.27$ 判为阴性,介于二者之间判为可疑。经重复性试验和交叉试验,结果表明,该方法特异性强、灵敏度高、重复性好。用已建立的 ELISA 方法检测临床血清样本 184 份,总阳性率为 68.5%。

关键词:猪流行性腹泻病毒;重组 N 蛋白;ELISA

中图分类号:S828 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0123-07

doi:10.7668/hbxb.2015.01.020

Development of an Indirect ELISA Method for Detecting Antibody Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus Based on Recombinant N Protein

GU Yun^{1,2},ZHOU Xiao-li²,YUAN Xiu-fang²,DU Xiao-li²,XU Li-hua²,
LI Jun-xing²,FANG Wei-huan¹,WANG Yi-cheng²

(1. Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. The Animal Husbandry and Veterinary
Institute of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: In order to determine the level of antibody against PEDV in swine serum. The PEDV recombinant N protein was expressed by *E. coli* and purified through native conditions purification method. Based on purified recombinant N protein, an indirect ELISA for detection of anti-PEDV antibodies was developed and its optimal reaction conditions were determined: antigen working concentration was 0.5 $\mu\text{g/mL}$, it was coated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h and 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight, serum samples dilution was 1:100, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min. HRP-labeled rabbit anti-pig IgG was diluted at 1:10 000, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min, the substrate for showing color was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. It was judged to be positive when the OD was greater than the cut off $\text{OD}_{450\text{nm}}$ of 0.30, as negative when $\text{OD}_{450\text{nm}}$ was smaller than 0.27, and as suspicious between 0.27 and 0.30. The established ELISA assay was confirmed to be good in specificity, sensitivity and repeatability by repeatability and cross test. A total of 184 clinical serum samples obtained from pig farms in Zhejiang Province were detected by using the established ELISA and the positive rate was 68.5%.

Key words: Porcine epidemic diarrhea; Recombinant N protein; ELISA

2010 年下半年以来,猪流行性腹泻病又在我国出现一轮新的暴发流行。最早发生在广西,然后湖南、华北、华东、山东、河北等地普遍发病,呈现全国性大流行,造成哺乳仔猪的大量死亡^[1-2]。据农业部流行病学中心统计,2011 年猪流行性腹泻(PED)

病引起猪的死亡数已占据所有我国现有猪病的首位。

猪流行性腹泻病毒属于冠状病毒科冠状病毒属的成员,PEDV 基因组为线形单股正链 RNA 病毒,基因组核酸具有感染性。基因组长为 27~33 kb,

收稿日期:2014-11-26

基金项目:浙江省三农六方项目(2012R22A60C01);浙江省重大科技专项重点农业项目(2012C12009-1)

作者简介:顾 昀(1987-),男,浙江杭州人,研究实习员,在读硕士,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。

通讯作者:王一成(1957-),男,浙江温岭人,研究员,硕士生导师,主要从事猪病学研究。

PEDV 基因组靠近 3' 端 5 kb 区域内有 5 个主要的开放阅读框(ORF)。编码 4 种结构蛋白:S 蛋白,sM 蛋白,M 蛋白(Membrane protein)和 N 蛋白(Nucleo-protein),位于 sM 基因上游的 ORF,命名为 ORF3,编码一个未知功能且具有多态性的产物。

N 蛋白为磷蛋白,相对分子量为 57 kDa。N 蛋白是比较保守的蛋白,病毒感染细胞中 N 蛋白较丰富。N 蛋白能与病毒多聚酶作用;或许还有可能同细胞因子作用,从而改变宿主细胞的转录。N 蛋白是 PEDV 的主要结构蛋白,产生的免疫反应最为迅速,可以产生高水平的抗 N 蛋白抗体,在建立 PEDV 分子生物学诊断方法方面具有重要应用价值。

用 ELISA 方法检测血清中病毒抗体水平是临床上常用的方法之一,截至目前,ELISA 抗体检测方法检测 PEDV 抗体水平在临床上极少应用。虽然许多学者对 PEDV ELISA 检测方法进行了研究探索,商品化的 PEDV 检测试剂盒都是用 PEDV 全病毒抗原包被的,在检测过程中其特异性还有待验证,因此,利用 PEDV 结构蛋白尤其是 N 蛋白作为包被抗原进行 PEDV 抗体检测,不仅可以提高其特异性,同时也可以提高检测的针对性,是将来 PEDV ELISA 检测方法的研究方向。

1 材料和方法

1.1 主要材料

Nco I 和 *Xho* I 内切酶,pUC-18T 购于大连宝生物公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 购自晶美公司;Ni-NTA 纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司;TMB 购自上海生工生物工程技术有限公司;血清样品稀释液为 0.02 mol/L PBS(pH 值 7.4),由浙江省农业科学院畜牧兽医研究所猪病实验室配置。

原核表达载体 pET-28a(+) 和 Rosetta™(DE3) 由本实验室保存。

PEDV 阴性血清:在海关隔离场,采自来源于非 PEDV 疫区进口种猪。

PEDV 阳性血清:经北京方程生物科技有限公司经销的猪流行性腹泻病毒全病毒包被抗原 ELISA 试剂盒检测为阳性的猪血清。

1.2 PEDV N 基因克隆与表达

分别用 *Nco* I 和 *Xho* I 对原核表达载体 pET-28a(+) 和 pT-N 重组质粒,进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。再用胶回收试剂盒提纯回收酶切后载体和目的基因。将酶切回收后的载体和目的基因进行连接、转化到受体菌 Rosetta™(DE3),

构建重组表达载体,经酶切鉴定后,送上海英骏生物技术有限公司测序验证阅读框的正确性。命名为 pET-N2。

将测序正确的 pET-N2 阳性转化子接种于 2 mL 含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 液体培养基,37 °C 振荡培养过夜。按 1:100 比例将过夜培养的细菌再转接种于 2 mL 含卡那霉素(50 μg/mL) LB 液体培养基,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6~0.8 时,用 1 mmol/mL IPTG 诱导表达,于诱导前和诱导后 4 h 分别取出 200 μL 细菌,高速离心,弃上清,加入 20 μL TE 溶液(pH 值 8.0)重悬,再加入等体积的 2×SDS 裂解缓冲液,煮沸 5 min 裂解细菌,高速离心 1 min,取上清,经 10% SDS-PAGE 电泳分析。

1.3 PEDV 重组 N 蛋白纯化

取按 1.2 步骤获得的裂解上清,用 Ni-NTA 进行纯化,按 QIAGEN 公司的 QIA espressionist™ 蛋白纯化系统操作指南略加改进进行,具体过程如下:取 500 μL Ni-NTA 离心去上清,加入 1 mL 的细菌裂解上清液,4 °C 作用 30 min,期间不断振摇,使 Ni-NTA 充分与表达蛋白结合。用 3 倍体积的洗涤液(50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L NaCl,40 mmol/L Imidazol,5% 甘油及 5 mmol/L β-巯基乙醇 pH 值 8.0)洗涤 2 次,用 5 mL 洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L NaCl,400 mmol/L Imidazol,5% 甘油及 5 mmol/L β-巯基乙醇 pH 值 8.0)洗脱。收集上清及洗脱液,经 10% SDS-PAGE 电泳检测重组 N 蛋白纯化结果。

1.4 重组 N 蛋白的 Western-Blotting 活性检测

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后,转印到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,加 1:100 稀释的 PEDV 阳性血清,37 °C 作用 1 h,加 1:5 000 稀释的兔抗猪 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体,37 °C 作用 1 h,二氨基联苯胺(DAB)缓冲溶液中显色 10 min,观察结果。

1.5 重组 N 蛋白抗原最佳包被浓度和抗体最佳稀释度的确定

取 96 孔 ELISA 板,将提纯的 PEDV 重组 N 蛋白用 pH 值 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液做不同浓度稀释,包被 ELISA 板,4 °C 过夜,取出后洗涤 3 次,每次 3 min。再用 5% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h 后洗涤。用阴、阳性血清作方阵滴定,于 37 °C 放置 1 h 后洗涤,每孔中加入 100 μL HRP 标记兔抗猪 IgG(1:10 000 稀释),于 37 °C 作用 1 h,洗涤;向每孔中加入 100 μL TMB 显色液,于 37 °C 作用 15 min,最后加入 100 μL 0.2 mol/L 硫酸终止反应,用

酶联检测仪测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 值,进行结果判定。

1.6 抗原包被时间的确定

以最适抗原浓度包被酶标板,100 μL /孔,分成 4 组。第 1 组:37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 4 h;第 2 组:37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 加 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被;第 3 组:37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 加 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被;第 4 组:4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。PEDV 阳、阴性血清分别作 1:100 稀释,ELISA 操作过程同 1.5,比较各组阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以确定最佳包被条件。

1.7 封闭液的确定

以最适抗原浓度 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 加 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被酶标板,洗涤后用 1% 明胶、5% 明胶、5% 脱脂乳、5% 脱脂乳 + Tris-HCl 4 种不同的封闭液进行封闭,100 μL /孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。PEDV 阴、阳性血清分别作 1:100 稀释,100 μL /孔,重复 2 孔,ELISA 操作过程同 1.5,比较各组阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以选择合适的封闭液。

1.8 酶标二抗最佳稀释度确定

以最适抗原包被浓度包被酶标板,最佳封闭液封闭,然后加入 1:100 阴阳性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,洗涤后加入 1:2 000,1:5 000,1:10 000,1:15 000 倍稀释辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后,加入底物 TMB 显色,比较阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以确定最佳酶标二抗稀释度。

1.9 封闭时间、血清最佳反应时间、酶标二抗 (SPA) 作用时间的确定

以最适抗原浓度和包被条件包被酶标板,洗涤后加入封闭液,200 μL /孔,分成 4 组,分别为封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。封闭后,加入稀释好的阴、阳性血清(1:100 稀释),100 μL /孔,重复 2 孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min。经洗涤后,加入新配的 TMB 100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min,加 0.2 mol/L 硫酸 100 μL 终止反应,比较各组阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以确定封闭时间;用 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液将已知的阴、阳性血清做 1:100 稀释后,于室温下分别作用 15,30,45,60 min,进行 ELISA 检测,比较阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以确定最佳血清反应时间;将辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 稀释到工作浓度(1:10 000),100 μL /孔,分别于室温下作用 15,30,45,60,75 min,比较阴、阳性血清的 OD 值和 P/N 值,以确定酶标二抗的工作时间。

1.10 底物最佳显色时间确定

用已经确定的最佳条件处理抗原、一抗、酶标二抗,在其他条件相同的情况下,加入底物显色液后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别避光反应 5,10,15,30 min,比较阴、阳性

血清的 OD 值和 P/N 值,以确定底物最佳显色时间。

1.11 间接 ELISA 操作程序和结果判定

1.11.1 间接 ELISA 操作程序 根据试验确定的最佳抗原包被浓度及包被时间、最佳血清稀释度及反应时间、最佳封闭液及封闭时间、最佳酶标 SPA 反应时间等条件确定间接 ELISA 操作程序。

1.11.2 结果判定 对 30 份 PEDV 为阴性的血清样品,在最适条件下进行间接 ELISA 测定,将所测数据进行统计学分析,求平均值 (AV) 和标准差 (SD),取置信区间上限: $\bar{X} + 3\text{ SD}$ 作为 PEDV 阳性血清的下限。初步确定间接 ELISA 的判定标准。

1.12 交叉试验

利用建立的间接 ELISA 方法对本实验室保存的 PEDV 阴、阳性血清及 CSFV、PRRSV 和 PRV 阳性血清进行检测,每份血清重复检测 4 孔。

1.13 重复性试验

1.13.1 批内重复 用同一抗原同时包被的 ELISA 板,对包括阴、阳性血清在内的 4 份样品进行检测,重复 4 孔,结果进行统计学分析,比较在同一抗原同时包被的 ELISA 板同一血清的变异系数。

1.13.2 批间重复 用同一抗原不同时间包被的 ELISA 板,对包括已知阴、阳性血清在内的 4 份样品进行检测,每份血清重复 4 孔,结果进行统计学分析,比较在同一抗原不同时间包被的 ELISA 板同一血清的变异系数。

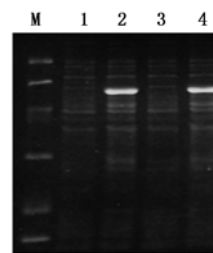
1.14 临床血清样品的检测

取浙江省不同地区猪场送检血清样品 184 份,用建立的 ELISA 方法进行 PEDV 抗体的检测。

2 结果与分析

2.1 PEDV N 基因的克隆与表达

将 PEDV N 基因克隆到 pET-28a 原核表达载体中,经 IPTG 诱导获得表达蛋白,表达蛋白大小为 50 kDa(图 1)。



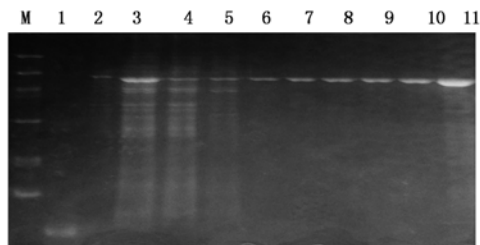
M. 蛋白质分子量标准;1,3. 表达菌未进行诱导;2,4. 表达菌经 IPTG 诱导表达。
M. Protein molecular weights;1,3. Express bacteria not induced;2,4. Express bacteria induced by IPTG.

图 1 PEDV N 基因表达结果

Fig.1 The result of PEDV N expression

2.2 PEDV N 重组表达蛋白的纯化

将表达的 PEDV N 蛋白经过 NIH 株纯化,获得纯化的重组 PEDV N 蛋白,其纯度达到 95% 以上(图 2)。



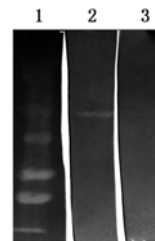
M. 蛋白质分子量标准;1. 表达菌液;2. 破碎沉淀;3. 破碎上清;4. 结合上清;5. pH 值 6.0 洗涤上清;6~10. 1 mL 洗脱;11. 5 mL 洗脱。
M. Protein molecular weights;1. Whole bacteria lysate;2. Broken precipitation;3. Broken supernatant;4. Binding supernatant;5. pH 6.0 washing supernatant;6~10;1 mL elution protein;11. 5 mL elution protein.

图 2 PEDV N 重组表达蛋白纯化

Fig.2 Examination of the purified recombination protein PEDV N

2.3 N 重组蛋白的活性鉴定

取纯化后的 N 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转印到硝酸纤维素膜上,分别与 PEDV 阴性、阳性血清作用。结果表明,该重组蛋白能与 PEDV 阳性血清发生特异性反应,而与阴性血清没有反应(图 3)。



1. 标准蛋白预染 Marker;2. 纯化蛋白与 PEDV 阳性血清反应;3. 纯化蛋白与阴性血清反应。

1. Prestained standard proteins;2. Reaction of the purified protein with the PEDV positive serum;3. Reaction of the purified protein with the PEDV negative serum.

图 3 N 重组表达蛋白免疫印迹分析

Fig.3 Western Blot analysis of N recombinant expression protein

2.4 ELISA 反应条件的建立

2.4.1 抗原最佳包被浓度与血清最佳稀释度的确定 通过方阵滴定试验,对已知阴、阳性血清的检测结果见表 1。在血清及包被抗原的稀释倍数较低时,阳性血清的 OD 值维持在一个较高水平,随着稀释倍数的增加,OD 值均呈现下降趋势。比较阴阳性血清不同稀释度的 P/N 值,在 P/N 值最大时,同时考虑节省包被抗原。确定抗原最佳包被浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而血清最佳稀释倍数为 1:100。

表 1 抗原最佳包被浓度及血清最佳稀释度的确定

Tab.1 The determination of the optimal coating concentration of antigen and the optimal dilution of serum

阳/阴性 OD 值 Positive/Negative OD value		血清稀释倍数 Serum dilution					
P/N 值 P/N value		25	50	100	200	400	800
蛋白包被浓度 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.125	0.79/0.12	0.71/0.09	0.53/0.07	0.36/0.07	0.25/0.06	0.14/0.07
		6.58	7.89	7.57	5.14	4.17	2.00
Coating concentration	0.25	1.00/0.11	1.18/0.10	0.71/0.07	0.68/0.06	0.47/0.06	0.17/0.07
		9.09	11.80	10.14	11.30	7.83	2.43
	0.5	0.98/0.15	1.07/0.10	0.95/0.07	0.62/0.06	0.29/0.06	0.18/0.08
		6.53	10.70	13.60	10.33	4.83	2.25
1		0.90/0.12	1.02/0.10	0.87/0.07	0.54/0.07	0.31/0.06	0.21/0.06
		7.50	10.20	12.40	7.71	5.17	3.5
2		0.89/0.14	1.12/0.11	0.75/0.08	0.69/0.08	0.33/0.07	0.22/0.08
		6.36	10.18	9.38	8.63	4.71	2.75
3		1.22/0.16	1.18/0.12	1.02/0.09	0.74/0.08	0.47/0.06	0.41/0.06
		7.63	9.83	11.30	9.25	7.83	6.83
4		1.02/0.16	0.95/0.13	0.98/0.09	0.71/0.08	0.44/0.08	0.31/0.07
		6.38	7.31	10.89	8.88	5.50	4.43
5		0.93/0.18	1.02/0.13	0.99/0.10	0.65/0.08	0.46/0.07	0.35/0.07
		5.12	7.85	9.90	8.13	6.57	5.00

2.4.2 最适抗原包被时间的确定 用最佳抗原包被浓度包被 ELISA 板,通过对不同的抗原包被时间 P/N 值进行比较,发现 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜时 P/N 最大,确定为抗原的最佳包被时间(表 2)。

2.4.3 最适封闭液的确定 用不同的封闭液对包被的酶标板进行封闭,试验结果表明,用含 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液作为封闭液时,P/N 值最大,确定 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液为最佳封闭液(表 3)。

表 2 最适抗原包被时间的确定

Tab. 2 The determination of optimal antigen coating time

项目 Item	37 ℃ 2 h, 4 ℃ 过夜 37 ℃ 2 h, 4 ℃ overnight	4 ℃ 过夜 4 ℃ overnight	37 ℃ 2 h
阴性 Negative	0.275	0.24	0.255
阳性 Positive	0.463	0.45	0.405
P/N	1.680	1.88	1.590

表 3 最适封闭液的确定

Tab. 3 The determination of optimal of the blocking buffers

项目 Item	1% 明胶 1% gelatin	5% 明胶 5% gelatin	5% 脱脂乳 5% skim milk	5% 脱脂乳 + Tris-HCl 5% skim milk + Tris-HCl
阴性 Negative	0.24	0.24	0.19	0.24
阳性 Positive	0.44	0.44	0.82	0.96
P/N	1.83	1.83	4.32	4.00

2.4.4 最适封闭时间的确定 用含 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液作为封闭液,分别 37 ℃ 2 h 加 4 ℃ 过夜,4 ℃ 过夜,37 ℃ 2 h。试验结果表明,用含 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液置 37 ℃ 封闭 2 h 再 4 ℃ 过夜,P/N 值最大,确定最佳封闭时间为 37 ℃ 2 h 后 4 ℃ 过夜(表 4)。

表 4 最适封闭时间的确定

Tab. 4 The determination of optimal sealing time

项目 Item	37 ℃ 2 h, 4 ℃ 过夜 37 ℃ 2 h, 4 ℃ overnight	4 ℃ 过夜 4 ℃ overnight	37 ℃ 2 h
阴性 Negative	0.19	0.20	0.19
阳性 Positive	1.31	1.25	1.16
P/N	6.89	6.25	6.11

2.4.5 血清最佳反应时间的确定 进行 ELISA 试验时,加入血清后,置 37 ℃ 下分别作用 15,30,45,60 min,试验结果表明,血清作用 45 min 时其 P/N 值最高,确定血清最佳反应时间为 45 min(表 5)。

表 5 血清最佳反应时间的确定

Tab. 5 The determination of the optimal serum reaction time

项目 Item	60 min	45 min	30 min	15 min
阴性 Negative	0.17	0.14	0.13	0.13
阳性 Positive	1.43	1.31	1.10	0.94
P/N	8.65	9.12	8.51	7.27

2.4.6 酶标二抗最佳稀释倍数的确定 将辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 分别作 1:2 000,1:5 000,1:10 000,1:15 000 倍稀释后,置 37 ℃ 作用 45 min。结果表明,酶标二抗稀释倍数为 1:10 000 时,P/N 值最高,因而确定辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 最佳稀释倍数为 1:10 000(表 6)。

2.4.7 酶标二抗最佳反应时间的确定 加入酶标

二抗之后,分别置 37 ℃ 作用 15,30,45,60,75 min,试验结果表明,酶标二抗作用 60 min,P/N 值最高,因而确定酶标二抗最佳反应时间为 60 min(表 7)。

表 6 酶标二抗最佳稀释倍数的确定

Tab. 6 The determination of the optimal dilution of

HRP-labeled Rabbit anti-pig IgG

项目 Item	1:2 000	1:5 000	1:10 000	1:15 000
阴性 Negative	0.40	0.23	0.16	0.16
阳性 Positive	2.27	1.39	1.01	0.84
P/N	5.71	6.18	6.32	5.41

表 7 酶标二抗最佳反应时间的确定

Tab. 7 The determination of the optimal reaction time of HRP-labeled Rabbit anti-pig IgG

项目 Item	75 min	60 min	45 min	30 min	15 min
阴性 Negative	0.17	0.15	0.13	0.11	0.08
阳性 Positive	1.17	1.08	0.92	0.67	0.36
P/N	6.95	7.16	6.97	5.89	4.42

2.4.8 最佳显色时间确定 用已经确定的最佳条件处理抗原、一抗、酶标二抗,在其他条件相同的情况下,加入底物显色液后,于 37 ℃ 下分别避光反应 5,10,15,30 min,结果底物反应 15 min 时 P/N 值最高,因此确定底物最佳显色时间为 15 min(表 8)。

表 8 底物最佳显色时间的确定

Tab. 8 The determination of the optimal chromogenic reaction time of the substrate

项目 Item	5 min	10 min	15 min	30 min
阴性 Negative	0.10	0.14	0.18	0.32
阳性 Positive	0.71	1.37	1.93	2.84
P/N	7.14	9.47	10.56	8.97

2.5 间接 ELISA 判定标准的确定

用建立的间接 ELISA 方法对临床 30 份 PEDV 阴性的猪血清进行检测,计算出阴性血清样品 OD_{450nm} 值的平均值(AV)为 0.21 和标准差(SD)为 0.03。因此,阳性样品检测下限为 $\bar{X} + 3SD = 0.30$ 。为了减少假阳性和假阴性血清出现的概率,将临界值加减一个标准差设为可疑区,即当 OD_{450nm} ≥ 0.30 时判为阳性;当 OD_{450nm} ≤ $\bar{X} + 2SD$ 即 OD_{450nm} ≤ 0.27 时判为阴性,介于两者之间判为可疑。

2.6 交叉试验

利用建立的间接 ELISA 方法对 PEDV 阳性血清、CSFV、PRRSV、PRV 阳性血清进行 PEDV 抗体检测,结果 PEDV 阳性血清 OD_{450nm} 值为 1.294,而 CSFV、PRRSV、PRV-gB 阳性血清 OD_{450nm} 值分别为 0.139,0.136,0.147。除 PEDV 阳性血清外,各检测血清 OD_{450nm} 值均小于 0.15,为阴性,即没有交叉反应(表 9)。

2.7 重复性试验

2.7.1 批内重复试验 用同一块抗原包被 ELISA

板,选取不同效价的 4 份血清样品,用建立的间接 ELISA 方法,使用同一批次包被的酶标板进行 3 次批内重复检测,每次每份血清 4 个重复。结果如下:其变异系数位于 4.6%~8.0%,小于 10%,表明同一样品在同一批试验中变异程度很小,具有良好的重复性(表 10)。

2.7.2 批间重复试验 采用不同批次包被酶标板,对包括已知阴、阳性血清在内的 4 份样品进行检测,

每份血清重复 4 孔,结果进行统计学分析,其变异系数位于 5.2%~8.7%,小于 10%,证明此间接 ELISA 方法批间重复性好(表 10)。

表 9 PEDV ELISA 检测方法的特异性

Tab. 9 Specific detection of PEDV ELISA

	PRRSV	PRV-gB	CSFV	PEDV
OD _{450nm} 值 OD _{450nm} value	0.136	0.147	0.139	1.294
判定结果 Result	-	-	-	+

表 10 PEDV ELISA 检测方法的批内重复试验和批间重复试验

Tab. 10 Inter-assay and Intra-assay repeatability of PEDV ELISA

样品序号 Sample number	批内重复试验 Inter-assay repeatability		批间重复试验 Intra-assay repeatability	
	平均数 + 标准差 AV + SD	变异系数/% CV	平均数 + 标准差 AV + SD	变异系数/% CV
1	1.837 + 0.093	5.0	2.093 + 0.110	5.2
2	1.268 + 0.069	5.4	1.682 + 0.146	8.7
3	0.553 + 0.025	4.6	1.327 + 0.100	7.6
4	0.657 + 0.053	8.0	1.677 + 0.146	8.7

2.8 临床血清样本的检测

采用建立的间接 ELISA 检测方法,对 2011 - 2013 年度在浙江地区采集的 184 份不同日龄的猪血清样本进行检测,结果显示(表 11),PEDV 总体

抗体阳性率为 68.5%,不同年龄段猪群的抗体阳性率差异巨大,其中母猪群抗体阳性率最高,为 88.5%,肥育猪为 26.5%,保育猪群为 45.9%。

表 11 浙江多个猪厂血清样品间接 ELISA 检测结果

Tab. 11 The detection results of indirect ELISA for multiple serum samples from Zhejiang pig factory

项目 Item	母猪 Sow	肥育猪 Store pigs	保育猪 Nursery pigs	总和 Sum
阳性数/份 Positive numbers	100.0	9.0	17.0	126.0
阴性数/份 Negative numbers	13.0	25.0	20.0	58.0
总计数/份 Sum	113.0	34.0	37.0	184.0
阳性率/% Positive rate	88.5	26.5	45.9	68.5

3 讨论

目前,猪流行性腹泻病毒是引起我国出生仔猪急性肠炎、水样腹泻的重要病原之一,但尚无商品化病毒血清抗体检测试剂盒。研究表明,N 蛋白具有较强的抗原性,在结构蛋白中所占比例较大,在感染的细胞中能够大量表达,而且在 PEDV 感染的早期,体内就能产生抗高水平的抗 N 蛋白抗体,因此,以 N 蛋白作为包被抗原,建立 PEDV ELISA 检测方法能够及早反应 PEDV 抗体水平,可用于该病毒抗体检测和流行病学研究^[3-5]。

Oh 等^[6]建立了 PEDV 间接 ELISA 诊断方法,与病毒血清中和试验对比结果表明,建立的 ELISA 方法具有较高的敏感性和特异性,可以用于 PEDV 的检测。Rodak 等^[7]利用 PEDV M 蛋白的单克隆抗体建立了敏感性强、特异性高的竞争阻断 ELISA 诊断方法,适于 PEDV 流行病学调查;Hou 等^[8]利用 PEDV 重组 N 蛋白抗原建立了检测 PEDV 血清的

ELISA 方法,为 PEDV 血清学监测提供手段。Sozzi 等^[9]用以单克隆抗体为基础建立的双抗体夹心 ELISA 方法,对 2006 - 2007 年收集到的 506 份具有肠炎症状的仔猪粪便样本进行 PEDV 检测,并与 RT-PCR 方法进行比较,结果二者具有很高的相关性。

国内对 PEDV 的 ELISA 诊断最早在 1987 年,于强等^[10]用 PEDV 吉毒株猪胎肠单层细胞培养物,通过冻融法制备抗原,建立了间接 ELISA 法检测 PED 抗体的方法。对 30 份直接免疫荧光证实的 PED 病猪群血清测定,97% 为阳性。陈茹等^[11]在 1997 年用细胞培养的 PEDV,经聚乙二醇分离纯化作为抗原,建立斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA)检测猪流行性腹泻(PED)抗体。利用此方法分别对来自加拿大、中国台湾省进口的种猪和海南省、广东省种猪群的血清样本共 834 份进行了检测,检测的抗体阳性率达 21%。王金良等^[12]建立了 PEDV 重组 N 蛋白 PPA-ELISA 方法,该方法具有较好的特异性。韩蓉等^[13]建立了以 PEDV 全病毒为包被抗原的

ELISA 方法,对江苏、上海、浙江、安徽地区 587 份猪血清样品进行检测,抗体阳性率达 56.76%,证明该方法具有较好敏感性、特异性和重复性,可用于抗体检测和流行病学调查。

本研究采用原核表达 PEDV N 蛋白作为包被抗原,与 PEDV 全病毒抗原相比纯化后的重组 N 表达蛋白具有更好地特异性。利用本研究建立的 PEDV ELISA 检测方法对 184 份临床血清样品进行检测,总阳性率达到 68.5%。其中母猪群抗体阳性率最高,为 88.5%,肥育猪为 26.5%,保育猪群为 45.9%。

总之,本研究所建立的 PEDV ELISA 检测方法具有良好的特异性、重复性和稳定性,将为我国 PEDV 的疫苗免疫水平监测和流行病学调查提供了一种简单、快速、价格低廉的血清学诊断方法,为进一步预防和控制 PED 提供条件,为开发高品质 PED 商品化诊断试剂盒奠定基础。

参考文献:

- [1] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, *et al.* Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161 – 163.
- [2] Li W T, Li H, Liu Y B, *et al.* New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350 – 1353.
- [3] 邓祖丽颖. 基于 S 蛋白检测猪流行性腹泻抗体间接 ELISA 方法的建立 [J]. *河南农业科学*, 2013, 42(8): 119 – 123.
- [4] 张曼丽, 徐博文, 舒 蕾, 等. 四川某规模化猪场仔猪腹泻病的诊疗体会 [J]. *河南农业科学*, 2012, 41(6): 155 – 157.
- [5] 宋维平, 徐福洲, 王金洛, 等. 抗猪流行性腹泻病毒卵黄抗体治疗效果研究 [J]. *华北农学报*, 2003, 18(1): 114 – 1115.
- [6] Oh J S, Song D S, Yang J S, *et al.* Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2005, 6(4): 349 – 352.
- [7] Rodak L, Valicek L, Smid B, *et al.* An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105(1): 9 – 17.
- [8] Hou X L, Yu L Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007(123): 86 – 92.
- [9] Sozzi E, Luppi A, Lelli D, *et al.* Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Research in Veterinary Science*, 2010, 88(1): 166 – 168.
- [10] 于 强, 王殿瀛, 宝 华, 等. 应用 ELISA 间接法检测猪流行性腹泻抗体的研究 [J]. *兽医大学学报*, 1987(2): 149 – 154.
- [11] 陈 茹, 罗 琼, 李树根, 等. 间接法 Dot-ELISA 检测猪流行性腹泻抗体的研究 [J]. *中国兽医杂志*, 1997(8): 10 – 13.
- [12] 王金良, 祖立闯, 唐 娜, 等. 猪流行腹泻病毒 N 蛋白表达与 PPA-ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(6): 801 – 807.
- [13] 韩 蓉, 时晓丽, 赵攀登, 等. 猪流行性腹泻病毒间接 ELISA 抗体检测方法建立与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2013(2): 1 – 6.