

王晨燕, 王隆柏, 吴学敏, 等. 猪流行性腹泻病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (8): 823—827.
WANG C-Y, WANG L-B, WU X-M, et al. Double Antibody Sandwich ELISA for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32 (8): 823—827.

猪流行性腹泻病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

王晨燕, 王隆柏, 吴学敏, 陈如敬, 车勇良, 周伦江*

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病疾病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 采用特异性好的鼠源抗猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 单克隆抗体为捕获抗体, 兔源多克隆抗体为检测抗体, 建立 PEDV 双抗体夹心 ELISA 检测方法。结果显示, 该方法的最佳反应条件为: 抗 PEDV 单克隆抗体 E1 包被质量浓度 $4.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 包被 2 h, 采用 5% BSA 封闭液封闭 1 h, 兔抗 PEDV 抗体工作质量浓度为 $5.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酶标二抗稀释度为 1:2000, 以 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.381$ 作为阳性判定标准。该 ELISA 方法对猪轮状病毒和猪传染性胃肠炎病毒无交叉反应。敏感度可达 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($5 \times 10^{3.12}$); 重复性变异系数小于 10%。采用该方法和 RT-PCR 方法同时检测临床样品 42 份, 阳性样品符合率为 92.30%, 表明建立的 PEDV 双抗体夹心 ELISA 检测方法具有特异性好、敏感性高和方便快捷等优点, 可用于 PEDV 快速检测。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

中图分类号: S 767.5

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 08—823—05

Double Antibody Sandwich ELISA for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

WANG Chen-yan, WANG Long-bai, WU Xue-min, CHEN Ru-jing, CHE Yong-liang, ZHOU Lun-jiang*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/
Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) was developed using the high specificity, mouse-derived monoclonal antibody (Mab) as the capture antibody and the rabbit-derived polyclonal antibody against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as the detecting antibody. The optimal reaction conditions for DAS-ELISA was determined to include a coating concentration of $4.40 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for PEDV MAb E1 with 1 h incubation at 37°C , the use of 5% BSA solution for blocking for 1 h, an application of $5.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in concentration of rabbit polyclonal antibodies against PEDV, a $2000 \times$ dilution of HRP, and the positive OD equal or greater than 0.381 at 450 nm wave length on the spectrophotometer measurement. The developed method showed no cross-reaction between porcine rotavirus and transmissible gastroenteritis virus. The detection sensitivity of the method was $30 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($5 \times 10^{3.12}$); and, the coefficient variation of repetition, less than 10%. Furthermore, a total of 42 clinical samples were positively detected by the method in conjunction with RT-PCR at a rate of 92.30%. Consequently, it was concluded that the newly developed DAS-ELISA methodology was highly specific, sensitive, rapid, and hence, applicable for PEDV detection.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; monoclonal antibody; double antibody sandwich ELISA

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是一种由冠状病毒引起的高度接触性肠道传染病, 年幼仔猪发病率高, 可表现呕吐、腹泻和死

亡, 剖检可见胃肠道内有未消化乳汁, 肠壁变薄近乎透明, 死亡率可达 100%^[1]。亚洲地区 PED 首次暴发于韩国, 并迅速传到其他国家, 在多个国家

收稿日期: 2017—05—16 初稿; 2017—07—07 修改稿

作者简介: 王晨燕 (1988—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: 329177624@qq.com)

* 通讯作者: 周伦江 (1973—) 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒学与分子生物学 (E-mail: lunjiang@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2017R1023-8); 福建省农业科学院青年创新基金项目 (MYQJ2015-2); 福建省科技创新平台建设项目——福建省畜禽疫病防控技术重大研发平台 (2014N2003-4)

流行。猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 于 2013 年首次在美国猪群中分离并鉴定出^[2-3]。目前, PED 已成为世界性养猪病害之一。

PEDV 核酸是单股正链具有感染性的 RNA, 有 6 个 ORF, 其编码的纤突蛋白 (S)、小膜蛋白 (E)、膜糖蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N) 为 PEDV 主要结构蛋白。福建 PEDV 流行毒株的 S 和 ORF3 变异程度较大, N 基因存在个别氨基酸变异, E 基因有高度保守性, M 基因除个别基因突变外也相对保守^[4-5]。

引起猪只出现腹泻症状的病因是多方面的, 需要实验室诊断来进行确诊。常见的 PEDV 检测方法主要是 RT-PCR 法、ELISA 法、胶体金法和免疫电镜法。RT-PCR 法和免疫电镜法需要特殊仪器设备和熟练的操作人员仅限实验室诊断, 而操作便捷的 ELISA 和胶体金法则常用于临床检测。由于缺少特异性好的检测试剂, 研制快速诊断 PEDV 的试剂成为研究重点。本研究在可识别 M 蛋白的抗 PEDV 单克隆抗体制备的基础上, 采用纯化的全抗原制备兔抗 PEDV 多克隆抗体, 通过优化反应条件建立检测 PEDV 的双抗体夹心 ELISA, 以期为 PEDV 临床样品的快速诊断提供更好的检测手段。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞株

猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGV)、猪轮状病毒和 PEDV MAb 杂交瘤细胞株 E1 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜病室保存。

1.2 主要试剂和仪器

HRP 标记的羊抗兔 HRP-IgG、TMB 和终止液购自博士德生物公司, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司。

Nanodrop 2000/2000C 分光光度计购自 Thermo 公司。

1.3 病毒纯化

取生长状况良好的 vero 单层细胞, 用 PBS 缓冲液洗 1 次, 加入 1 : 100 稀释的 PEDV 细胞培养物 1 mL 和终浓度为 6 mg · mL⁻¹ 胰酶, 37℃吸附 1 h 后, 加入终浓度 6 mg · mL⁻¹ 胰酶无血清的 DMEM 培养液, 观察细胞病变 (CPE) 达 80% 以上收获病毒, 10 000 r · min⁻¹ 离心 1 h, 取上清液, 50 000 r · min⁻¹ 离心 3 h, 采用蔗糖密度梯度

离心法收获病毒^[6], 分装后 -70℃ 保存。

1.4 PEDV 的 MAb 的制备

按常规方法复苏 PEDV MAb 杂交瘤细胞株 E1 并制备小鼠腹水, 采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水^[7], 并用建立的间接 ELISA 检测抗体效价, 用 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计测蛋白浓度。

1.5 兔抗 PEDV 多克隆抗体的制备和纯化

将纯化的 PEDV 病毒液稀释至 1 mg · mL⁻¹, 与等量弗氏完全佐剂乳化后背部多点注射清洁级大白兔, 每只注射 1 mL, 2 周后将病毒液与等量弗氏不完全佐剂乳化后加强免疫 2 次, 每次间隔 2 周。最后 1 次免疫后第 15 d 采血并分离血清, 采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化后检测多抗效价, 用 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计测蛋白浓度。

1.6 PEDV 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

1.6.1 双抗体夹心 ELISA 基本操作步骤 采用纯化的腹水包被酶标板, 37℃ 包被; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入含 5% BSA 的 PBST 封闭液, 4℃ 封闭过夜; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入待检样品, 37℃ 反应 1 h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入纯化的抗 PEDV 多克隆抗体 37℃ 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入稀释后的羊抗兔 IgG-HRP 二抗孵育一定时间后, 加入终止液, 读取数值。以 OD_{450nm} 值接近 1, S/N 值 > 2, 作为阳性判定依据。

1.6.2 捕获抗体和检测抗体稀释倍数的确定 采用方阵滴定法, 将纯化的腹水以 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1600、1 : 3200、1 : 6400 和 1 : 12800 进行稀释, 每孔加入 100 μL, 设置 2 个复孔, 37℃ 包被 2 h, 检测纯化的 PEDV 病毒液; 同样将抗 PEDV 多克隆抗体以 1 : 100 倍比稀释后加入酶标板进行检测, 根据 OD_{450nm} 值和 S/N 值选择最佳捕获抗体和检测抗体稀释倍数。

1.6.3 捕获抗体包被条件的确定 用 0.05 mol · L⁻¹ 碳酸盐稀释纯化腹水, 包被条件 37℃ 包被 2 h、4℃ 包被 12 h 和 37℃ 2 h 加 4℃ 12 h。其他条件相同进行 ELISA 试验, 根据 OD_{450nm} 值和 S/N 值确定最佳包被条件。

1.6.4 封闭液浓度和封闭时间的确定 采用 2% BSA、3% BSA 和 5% BSA 封闭液进行 37℃ 封闭 1 h, 其他条件相同进行 ELISA 试验。确定最佳封闭液浓度后封闭时间以 37℃ 封闭 1 h、4℃ 封闭 12 h 和 37℃ 1 h 加 4℃ 12 h 进行封闭, 观察封闭效果, 根据 OD_{450nm} 值和 S/N 值确定最佳封闭液浓度和封闭时间。

1.6.5 抗原作用时间的确定 确定捕获抗体和检测抗体稀释倍数，经适合的封闭液封闭后，加入纯化的病毒液，以不加入抗原为阴性对照，37℃反应60、90 min，根据 OD_{450nm} 值确定最佳抗原作用时间。

1.6.6 酶标二抗浓度和作用时间的确定 确定捕获抗体和检测抗体稀释倍数，酶标二抗以1:1000、1:2000、1:3000、1:4000和1:5000稀释进行试验，确定最佳酶标二抗浓度后作用时间以30、60、90 min孵育，根据 OD_{450nm} 值确定最佳作用时间。

1.7 ELISA 结果判定的标准

采用建立的 ELISA 方法检测经 RT-PCR 鉴定为阴性的样品 20 份，计算 OD_{450nm} 平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD)。以样品的 OD_{450nm} 值 $\bar{X}+3SD$ 为阳性临界值。

1.8 ELISA 特异性试验

采用建立的 ELISA 方法对 PEDV、TGV 和轮状病毒进行检测，每个样品 2 个复孔，确定该方法特异性。

1.9 ELISA 敏感性试验

PBS 稀释纯化 PEDV 从 1:10 开始二倍稀释至 1:2560，每个稀释度 2 个复孔，采用建立的 ELISA 方法进行检测，确定该方法敏感度。

1.10 ELISA 重复性试验

在同一酶标板内检测 5 份阳性样品，每个样品 3 个重复，计算批内变异系数。不同批次酶标板对同一样品进行检测，每个样品 3 个重复，计算批间变异系数。

1.11 临床样品检测

取自临床发生腹泻，出现死亡的仔猪的小肠及内容物，研磨后 1:10 加入生理盐水制成匀浆，-20℃反复冻融 3 次，4℃、4000 r·min⁻¹ 离心 20 min，收集上清液用建立的 ELISA 方法与 RT-PCR 方法同时检测，评价该方法的特异性、敏感性和符合率。

2 结果与分析

2.1 病毒纯化

将细胞培养的 PEDV 经过蔗糖密度梯度离心纯化后，用 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计测其纯化病毒的蛋白质量浓度为 4.8 mg·mL⁻¹。

2.2 PEDV MAb 和多抗的纯化和效价测定

用 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计测其纯化后 MAb 和多抗的蛋白质量浓度分别为 3.52、

3.55 mg·mL⁻¹。间接 ELISA 方法测定纯化后 MAb 和多抗效价均为 10⁴。

2.3 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法的建立和反应条件优化

在建立 PEDV 双抗体夹心 ELISA 检测方法时对捕获抗体最佳包被浓度和时间、封闭液浓度选择和封闭时间、抗原最佳作用时间、免抗最佳工作浓度和工作时间和酶标二抗稀释度和作用时间进行反应条件优化。结果显示，PEDV 双抗体夹心 ELISA 的最佳反应条件为：抗 PEDV 单克隆抗体作为捕获抗体，包被质量浓度为 1:800 (4.40 μg·mL⁻¹)，37℃包被 2 h，采用 5% BSA 封闭液，37℃封闭 1 h；抗原最佳作用时间 37℃，90 min；免抗 PEDV 抗体作为检测抗体，工作质量浓度为 1:600 (5.91 μg·mL⁻¹)，37℃作用 1 h，酶标二抗稀释度为 1:2000，37℃作用 1 h。

2.4 ELISA 结果判定的标准

采用建立的 ELISA 方法检测经 RT-PCR 鉴定为阴性的样品 20 份，计算 OD_{450nm} 平均值为 0.216，标准差 0.055。根据公式 $\bar{X}+3SD$ 计算，即样品 OD_{450nm} 值 ≥ 0.381 判断为阳性。

2.5 ELISA 特异性

采用建立的 ELISA 方法同时对 PEDV、TGV 和轮状病毒进行检测，每个样品 3 次重复检测，结果显示只有 PEDV 的 OD_{450nm} 值 > 0.381 ，TGV 和轮状病毒检测为阴性，表明该方法特异性好（图 1）。

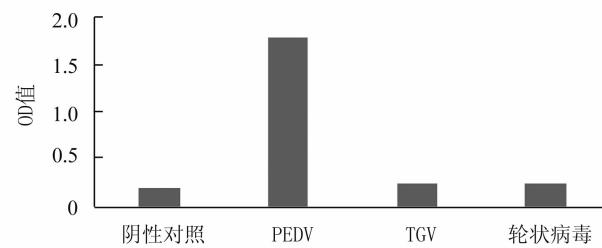


图 1 双抗体夹心 ELISA 特异性试验

Fig. 1 Specificity of DAS-ELISA

2.6 ELISA 敏感性

PBS 稀释纯化 PEDV 从 1:10 开始二倍稀释至 1:2560，每个稀释度 2 个复孔，采用建立的 ELISA 方法进行检测，以抗原的稀释浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，其线性回归方程为 $y = 4.859x + 0.272$ ，线性回归常数 $R^2 = 0.9974$ ，检测范围为 30~480 μg·mL⁻¹。该方法最低可检测 30 μg·mL⁻¹ ($5 \times 10^{3.12}$) 的病毒

(图 2)。

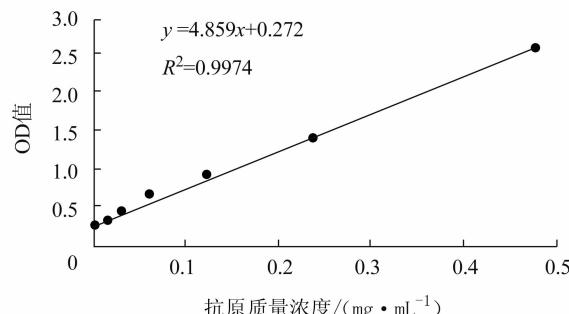


图 2 双抗体夹心 ELISA 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of DAS-ELISA

2.7 ELISA 重复性

对 5 份不同 PEDV 阳性样品进行批内重复和批间重复试验, 结果(表 1)显示批内和批间的变异系数均小于 10%, 表明建立的 PEDV 双抗体夹心法有较好的重复性。

表 1 批内和批间重复试验结果($n=5$)

Table 1 Intra- and inter-batch reproducibility test results on DAS-ELISA

样品	批内重复试验			批间重复试验		
	平均数	方差	变异系数 /%	平均数	方差	变异系数 /%
1	1.050	0.021	2.003	0.778	0.023	2.998
2	0.655	0.020	3.128	0.897	0.036	4.056
3	0.774	0.031	4.007	0.920	0.033	3.588
4	0.589	0.018	3.122	0.691	0.020	2.975
5	1.255	0.058	4.589	1.320	0.049	3.745

2.8 临床样品检测

采用建立 PEDV 双抗体夹心 ELISA 和 RT-PCR 同时检测 42 份临床样品, 检测结果显示用建立的 ELISA 检测出阳性样品 12 份, 阴性样品 30 份; 用 RT-PCR 检测出阳性样品 13 份, 阴性样品 29 份, RT-PCR 检测为阴性样本, 该方法也检测为阴性。阴性样品符合率为 100%, 阳性样品符合率为 92.30%。表明该方法具有很好的特异性和敏感性, 可用于临床对 PEDV 的检测。

3 讨论与结论

猪流行性腹泻病全球范围内流行, 严重危害养猪业的发展^[8]。即使是健康猪群也可能存在 PEDV 的潜在感染^[9]。由于临床缺少相应的检测设备和快速诊断手段, 基层兽医人员无法较快地对临床症状

相似的腹泻性疾病进行准确鉴别诊断, 容易出现误诊延误病情, 因此快速检测临床 PEDV 已成为生产中亟待解决的问题。

双抗体夹心 ELISA 法常用于临床抗原的检测, 且受检样品无须稀释可直接进行检测, 其灵敏度相对高于间接 ELISA, 该方法检测特异性的关键在于捕获抗体和检测抗体的选择^[10-11]。已制备的 PEDV MAb E1 可识别 PEDV M 蛋白, 只识别单一抗原决定簇, 与抗原结合特异性强, 包被 96 孔板用于捕获抗原保证检测特异性, 免抗 PEDV 抗体可结合多个抗原决定簇, 亲和性高, 可提高检测灵敏度。因此选用单抗作为捕获抗体, 多抗作为检测抗体建立 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法^[12]。

李一经等^[13]利用纯化的病毒免疫小鼠制备单抗, 建立猪排泄物中 PEDV 检测方法, 检测临床样品阳性样品符合率 90.5%。张清真等^[14]采用商品化的单克隆抗体作为捕获抗体, 生物素标记的抗 PEDV IgG 作为检测抗体, 建立检测 PEDV 的生物素-亲和素系统双抗体夹心 ELISA 方法, 与 RT-PCR 符合率为 100%。本试验通过方阵法确定最佳 PEDV MAb 包被浓度和抗 PEDV 兔抗工作浓度分别为 1 : 800 ($4.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 1 : 600 ($5.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。PEDV MAb 37°C 包被 2 h; 采用 5% BSA 封闭液封闭 1 h 后, 加入抗原反应 90 min; 免抗 PEDV 抗体的作用时间 1 h; 酶标二抗稀释度为 1 : 2000, 作用时间 1 h; 以 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geqslant 0.381$ 作为阳性判定标准, 最低可检测 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($5 \times 10^{3.12}$) 的病毒。用建立的方法检测 PEDV 结果为阳性, TGV 和轮状病毒结果为阴性, 表明该方法具有很好的特异性。此外, 本研究采用建立的 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法与 RT-PCR 同时进行临床样品检测比较, 二者符合率达到 92.3%, 表明该方法可用于 PEDV 临床样品的快速检测。综上所述, 本试验建立的 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法具有很好的临床应用价值, 为 PEDV 流行病学调查提供了有效的工具。

参考文献:

- [1] MARTELLI P, LAVAZZA A, NIGRELLI A D, et al. Epidemic of diarrhea caused by porcine epidemic diarrhea virus in Italy [J]. Vet Rec, 2008, 162: 307-310.
- [2] LUO Y, ZHANG J, DENG X, et al. Complete genome sequence of a highly prevalent isolate of porcine epidemic diarrhea virus in South China [J]. J Virol, 2012, 86 (17): 9551.
- [3] VLASOVA A N, MARTHALER D, WANG Q, et al. Distinct

- characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013 February 2014 [J]. *Emerg Infect*, 2014, 20 (10): 1620—1628.
- [4] 王隆柏, 林裕胜, 车勇良, 等. 猪流行性腹泻病毒S、N和ORF3基因的遗传变异分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (11): 1830—1836.
- [5] 王隆柏, 王晨燕, 林裕胜, 等. 猪流行性腹泻病毒E和M基因的克隆及变异分析 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (6): 533—538.
- [6] 毛雅元, 张桂红, 葛俊伟, 等. 猪流行性腹泻病毒地方株LJB/03分离及培养特性 [J]. 病毒学报, 2010, 26 (6): 483—489.
- [7] 孙秀萍, 宋晗星, 苏高莉, 等. 水泡性口炎病毒双抗体夹心ELISA检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34 (8): 637—641.
- [8] CHANG S H, BAE J L, KANG T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Cells*, 2002, 14: 295—299.
- [9] 吴玉璐, 朱建平, 杨莘, 等. 猪流行性腹泻病毒N基因的表达及抗原性分析 [J]. 动物预防学报, 2013, 35 (4): 299—303.
- [10] HUTCHINGS G H, FERRIS N P. Indirect sandwich ELISA for antigen detection of African swine fever virus: comparison of polyclonal and monoclonal antibodies [J]. *J Virol Methods*, 2006, 131 (2): 213—217.
- [11] PANADERO R, VAZQUEZ L, COLWELL D D, et al. Evaluation of an antigen capture ELISA for the early diagnosis of Hypoderma lineatum in cattle under field conditions [J]. *Vet Parasitol*, 2007, 147 (3—4): 297—302.
- [12] 张小兵, 邸祿芹, 吴萌, 等. 单克隆抗体与多克隆抗体配对ELISA方法比较 [J]. 生物技术通报, 2009, (11): 125—129.
- [13] 李一经, 刘博, 姜艳平, 等. 双抗体夹心ELISA检测排泄物PEDV [J]. 东北农业大学学报, 2015, 46 (2): 1—10.
- [14] 张清真, 陶洁, 殷秀辰, 等. 猪流行性腹泻病毒双抗体夹心ELISA方法的建立 [J]. 上海农业学报, 2017, 33 (1): 134—137.

(责任编辑:张梅)