

猪O型口蹄疫病毒抗体化学发光酶联免疫检测方法的建立

崔辰^{1,2*}, 黄立纲^{4*}, 李晶¹, 邹兴启³, 朱元源³, 谢磊⁵, 赵启祖³, 杨利敏¹, 刘文军¹

- 1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 中国兽医药品监察所, 北京 100081
- 4 清华大学第一附属医院检验科, 北京 100016
- 5 北京市动物卫生监督所, 北京 100044

崔辰, 黄立纲, 李晶, 等. 猪O型口蹄疫病毒抗体化学发光酶联免疫检测方法的建立. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1519–1530.
Cui C, Huang LG, Li J, et al. Establishment of chemiluminescent enzyme immunoassay for detecting antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in swine. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1519–1530.

摘要: 表达并纯化猪O型口蹄疫病毒(FMDV)VP1重组蛋白作为检测抗原,建立了一种快速检测猪O型口蹄疫病毒抗体的化学发光酶联免疫(CLEIA)检测方法。建立的VP1-CLEIA方法特异性为100%,板内变异系数在1.10%–6.70%之间,板间变异系数在0.66%–4.80%之间,具有较好的特异性和重复性,且灵敏度高于ELISA方法。通过对山东、辽宁、河北地区采集的250份临床血清的检测表明,该方法与间接ELISA试剂盒的符合率为93.50%,与液相阻断ELISA试剂盒的符合率为94.00%,表明本次建立的VP1-CLEIA检测方法可以用于猪O型FMDV感染或疫苗免疫后抗体水平检测。

关键词: O型口蹄疫病毒, VP1蛋白, 化学发光酶联免疫

Received: March 10, 2016; **Accepted:** May 13, 2016

Supported by: Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-005-001).

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: Limin Yang. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lmyang@im.ac.cn

中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-005-001) 资助。

Establishment of chemiluminescent enzyme immunoassay for detecting antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in swine

Chen Cui^{1,2*}, Ligang Huang^{4*}, Jing Li¹, Xingqi Zou³, Yuanyuan Zhu³, Lei Xie⁵, Qizu Zhao³, Limin Yang¹, and Wenjun Liu¹

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

4 Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

5 Beijing Animal Health Inspection Institute, Beijing 100044, China

Abstract: Recombinant structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus serotype O was expressed in *Escherichia coli* and then purified using Nickel affinity chromatography. A chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) method was established using the purified recombinant protein as coating antigen to detect antibody of foot-and-mouth disease virus serotype O in swine. The specificity of VP1-CLEIA method is 100%. The coefficients of variation in the plate and between plates are 1.10%–6.70% and 0.66%–4.80%, respectively. Comparing with the commercial indirect ELISA kit or liquid phase block ELISA kit, the calculated coincidence rate is 93.50% or 94.00%. The high specificity and stability suggested this detection method can be used to monitor the antibody level of foot-and-mouth disease virus serotype O in swine.

Keywords: foot-and-mouth disease virus serotype O, VP1 protein, chemiluminescent enzyme immunoassay

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的偶蹄动物急性、热性、高度接触性传染病, 传播迅速、感染率高^[1]。FMDV 主要通过呼吸道和消化道传播, 仅数个感染性病毒粒子便可引起易感动物发病, 甚至造成世界性的大流行, 给畜牧业带来极其严重的经济损失, 因此 FMDV 是世界各国检疫和防疫的重点对象^[2]。FMDV 有 7 个血清型, 分别为 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 型, 其中 O 型、A 型和 Asia1 型在中国交替流行, 且涉及面广、疫情复杂、破坏性强^[3]。目前我国预防和控制口蹄疫主要以疫苗免疫为主, 但 FMDV 的血清型众多, 不同亚型的疫苗之间无交叉保护作用, 且

国内外口蹄疫疫苗质量参差不齐, 因此建立一种简便、快速、灵敏度高的 FMDV 感染和/或免疫后抗体检测方法对预防和控制口蹄疫的发生和流行具有十分重要的意义。

目前 FMDV 的检测方法主要分为 3 类, 包括血清学诊断技术、生物学试验和分子生物学诊断技术。在血清学诊断技术中, 世界动物卫生组织 (World animal health organization, OIE) 推荐的检测 FMDV 抗体的标准方法为中和试验以及液相阻断 ELISA (LPBE), 其中血清中和试验需要使用活病毒, 在普通实验室难以完成^[4]。液相阻断 ELISA 可以用于替代中和试验检测血清中产生的相应的保护性抗体^[5], 但同样操作费时。以灭活病毒作为抗原建立的间接 ELISA 方

法与上述两种方法相比,具有灵敏、快速、操作简便等优点^[6],但此方法存在病毒灭活不全的风险以及病毒纯化较为困难的问题^[7]。为降低病毒传播风险且不影响病毒的抗原性,使用原核表达系统或杆状病毒系统表达病毒的重组结构蛋白,并将其作为检测抗原是目前的主要研究方向^[8]。宋妮等^[9]采用原核表达的重组结构蛋白作为包被抗原建立的猪 O 型 FMDV 间接 ELISA 检测方法,通过对 200 份田间血清样品的检测表明,此方法与液相阻断 ELISA 的符合率为 97%,具有较好的特异性和敏感性。

化学发光酶联免疫检测 (Chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) 是将化学发光体系与 ELISA 技术相结合,用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术,其基本原理是化学发光底物分子在酶的催化下,吸收氧化反应中的能量跃迁到激发态,处于激发态的分子以光辐射的形式返回基态时会产生光,称为化学发光^[10]。化学发光的强度与反应物或产物的浓度成正比,因此可以通过测量发光强度,绘制标准曲线来测量待测物的浓度,实现定量分析^[11]。与普通间接 ELISA 检测方法相比,CLEIA 同样具有操作简便、特异性高的优势,且其灵敏度和精确度均优于普通 ELISA,并且由于 CLEIA 最后测定的是光子的量,对检测者无害、检测范围广,还能够定量检测,是理想的标记免疫测定方法^[12-13]。CLEIA 已被欧盟列为牛海绵样脑病的快速检测方法之一。Buschmann 等^[14]于 2004 年使用间接 ELISA、夹心 ELISA、Eastern blotting 及 CLEIA 四种方法检测 312 份绵羊海绵样脑病标准阳性血清样本,其中 CLEIA 的检出率几乎可达 100%,而其他 3 种方法的检出率只有 80%左右。CLEIA 由于较

ELISA 方法灵敏度和精确度更高,因此已被广泛应用于肿瘤标记物检测、糖尿病、心脏病、高血压、艾滋病以及食品安全检测,但是在动物疫病检测领域,国内尚未见报道。

FMDV 为单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 8.5 kb,编码组成病毒衣壳的蛋白为 4 种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 以及 10 种成熟的非结构蛋白 (L、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 及 3AB 和 3ABC 复合体)^[15]。在 FMDV 的 4 种结构蛋白中,VP1 携带引发宿主细胞对 FMDV 免疫反应的关键性抗原表位,暴露于病毒粒子表面,单独的 VP1 蛋白即可刺激机体产生中和抗体,是 ELISA 中有效的目标抗原^[16]。我国农业部规定,O 型 FMDV 的 VP1 结构蛋白 ELISA 检测方法不仅可以用来检测病毒感染后动物体内抗体水平,还可以用于疫苗免疫后抗体水平的监测。我国现有的口蹄疫疫苗大部分为灭活疫苗,其经过一系列的制备过程后,最终的纯化浓缩抗原中只包含病毒部分结构蛋白,而除 3D 之外的大部分非结构蛋白已被去除^[17]。动物经口蹄疫疫苗免疫后,体内会产生大量针对结构蛋白的抗体。因此为建立一种快速、安全的猪 O 型 FMDV 抗体检测方法,本试验以原核表达的 VP1 重组蛋白作为抗原,初步建立了猪 O 型 FMDV 抗体 CLEIA 检测方法,其灵敏度优于目前的 ELISA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 重组质粒、菌株

包含猪 O 型 FMDV VP1 基因的重组质粒 pET-28a-VP1 由本实验室构建并保存;大肠杆菌 Rosetta (DE3) 由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器和试剂

化学发光免疫分析仪购自北京泰格科信有限公司;HRP-羊抗猪 IgG 酶标二抗购自 Earthox 公司;SuperSignal ELISA Femto Luminol/Enhancer Solution 购自 Thermo Scientific 公司;O 型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒、O 型口蹄疫病毒抗体液相阻断 ELISA 试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所;猪 O 型口蹄疫 ELISA 抗体检测试剂盒购自武汉科前动物生物制品有限责任公司;其他常规试剂均为国产分析纯。

1.1.3 血清

猪 O 型 FMDV 标准阳性血清由中国兰州兽医研究所惠赠;猪 A 型 FMDV 阳性血清、猪 Asia 1 型 FMDV 阳性血清、猪 O 型 FMDV 阴性血清、猪伪狂犬病毒阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪细小病毒阳性血清和猪圆环病毒阳性血清由本实验室保存;250 份临床猪血清采集自山东、辽宁和河北等地。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a-VP1 重组蛋白的纯化、表达和复性

将 pET-28a-VP1 重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞,挑取单菌落转接至含终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至菌液 OD_{600} 在 0.6–0.8 之间,取出少量诱导前全菌作为对照,在剩余培养物中加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG),37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。超声破碎菌体后分别收集上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,鉴定目的蛋白的表达。收集超声后沉淀,使用 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化重组蛋白。SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。纯化后蛋白透析复性,复性产物

使用 Bradford 法^[18]测定蛋白含量,500 $\mu\text{L}/\text{管}$ 分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.2 蛋白最佳包被浓度的确定

纯化后蛋白用碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6) 从 1:10 开始倍比稀释至 1:160,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入化学发光板,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 20 h。PBST 洗涤,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗 4 次,每次 3 min,拍干。加入 3%酪蛋白 (Casein)+1%蔗糖-PBST 混合封闭液 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。PBST 洗涤,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗 4 次,每次 3 min,拍干。猪 O 型 FMDV 标准阳性、阴性血清用封闭液 1:32 稀释后加入酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。PBST 洗涤,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗 5 次,每次 3 min,拍干。HRP-羊抗猪 IgG 酶标二抗用封闭液 1:50 000 稀释后加入酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。PBST 洗涤,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗 5 次,每次 3 min,拍干。加化学发光底物 (鲁米诺),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,避光显色 5 min。用化学发光免疫分析仪进行检测,将 P/N 值最大时的抗原浓度作为最佳蛋白包被浓度。

1.2.3 最佳封闭条件的确定

以抗原最佳包被浓度包被酶标板,分别以 3% BSA-PBST,1%明胶-PBST,10%新生牛血清-PBST,3%酪蛋白+1%蔗糖-PBST 混合液封闭,并选用 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 60、90 和 120 min 三个时间梯度进行比较,使用化学发光底物显色后,比较阳性血清和阴性血清的发光值,根据 P/N 比值确定最适合的封闭条件。操作过程同前。

1.2.4 酶标二抗工作浓度的确定

按已确定的最佳抗原包被浓度包被化学发光板,使用最佳封闭条件进行封闭,将 HRP-羊抗猪 IgG 酶标二抗用封闭液稀释为 1:5 000、1:10 000、1:20 000 和 1:40 000 四个梯度,使用化学发光底物显色,观察显色结果,确定

最佳酶标二抗工作浓度。

1.2.5 判定标准的确定

取 10 份猪 O 型 FMDV 阴性血清进行 CLEIA 检测, 每份血清重复两孔取平均值, 操作过程同前, 计算 10 份标准阴性血清化学发光值的平均值 (x_1) 和标准差 (s_1)。由于武汉科前生物生产的 ELISA 检测试剂盒只制定了免疫合格的判定标准, 未界定感染与否的阴阳血清判定标准, 因此本实验同时对该商品试剂盒的阴阳血清判定标准进行了界定。取 10 份猪 O 型 FMDV 阴性血清进行 ELISA 检测, 每份血清重复两孔取平均值, 按照试剂盒说明书进行操作, 计算 10 份标准阴性血清的 OD_{630} 平均值 (x_2) 和标准差 (s_2)。根据统计学原则, 待检血清的化学发光值 $\geq x_1 + 2s_1$ 或 OD_{630} 值 $\geq x_2 + 2s_2$ 时, 则可以在 99.9% 的水平上判为阳性。因此将 $x_1 + 2s_1$ 所得的值定为 VP1-CLEIA 方法阴阳性血清的界限, 将 $x_2 + 2s_2$ 的值确定为 ELISA 商品试剂盒的阴阳血清判定标准。

根据《2016 年国家动物疫病监测与流行病学调查计划》的规定, 猪只在接受 O 型 FMDV 灭活疫苗免疫后 28 d, 使用正向间接血凝试验检测血清中的抗体效价 ≥ 32 , 即可判定为免疫合格。本次建立的 CLEIA 检测方法中, 同时确定了是否免疫合格的判定标准。取 10 份经正向间接血凝试验判定抗体效价为 1:32 的猪 O 型 FMDV 阳性血清进行 CLEIA 检测, 每份血清重复两孔取其平均值, 操作过程同前。计算 10 份标准血清化学发光值的平均值 (x_3) 和标准差 (s_3), 将 $x_3 + 2s_3$ 所得的值确定为是否免疫合格的界限。

1.2.6 特异性试验

用建立好的 CLEIA 方法分别检测猪伪狂犬

病毒阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪细小病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪 A 型 FMDV 阳性血清以及猪 Asia 1 型 FMDV 阳性血清, 同时设猪 O 型 FMDV 阳性、阴性血清对照, 观察 CLEIA 方法的特异性以及交叉反应性。

1.2.7 灵敏度试验

将已经用正向间接血凝试验标定好抗体效价的标准阳性血清 (1:512) 用封闭液按 1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048、1:4096 的稀释度进行稀释, 其余按最适反应条件进行检测, 判定标准采用 1.2.5 确定的阴阳性血清界定标准, 观察建立的 CLEIA 方法的敏感性。同时, 用武汉科前生物生产的猪 O 型口蹄疫 ELISA 抗体检测试剂盒进行平行检测, 操作方法按试剂盒说明书进行。

1.2.8 重复性试验

将重组蛋白以最佳浓度包被化学发光板, 选取 4 份血清, 每份血清重复 4 孔, 按已建立的最适反应条件检测, 进行板内重复性试验, 对结果进行统计学分析, 计算变异系数。将重组蛋白以最佳浓度包被 4 块化学发光板, 使用相同的 4 份血清进行板间重复性试验, 对结果进行统计学分析, 计算变异系数。

1.2.9 对比试验

用建立好的 VP1-CLEIA 方法检测采集自山东多个猪场的血清样本 200 份, 用 1.2.5 确定的是否免疫合格的标准判定结果, 检测结果与武汉科前生物生产的猪 O 型口蹄疫 ELISA 抗体检测试剂盒进行对比。

对近 3 年采集自山东、辽宁、河北等地接种过猪 O 型 FMDV 灭活疫苗猪场的 50 份血清样本用建立好的 VP1-CLEIA 方法进行检测, 用 1.2.5 确定的阴阳性血清的标准判定结果, 并同

国标试剂盒 O 型口蹄疫病毒液相阻断 ELISA 试剂盒的检测结果进行对比。

2 结果与分析

2.1 *pET-28a-VP1* 重组蛋白的表达和纯化

将重组质粒 *pET-28a-VP1* 转化 Rosetta (DE3) 宿主菌后进行培养诱导表达, 分别取诱导前菌液, 诱导后菌液超声破碎的菌体沉淀和上清进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 1 所示。诱导后产物有重组蛋白表达, 分子量约为 27 kDa, 与预期大小一致, 以包涵体的形式存在, 上清未观察到重组蛋白条带。诱导表达产物的包涵体经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 得到分子量在 27 kDa 左右的高纯度重组蛋白, 结果如图 2 所示。

2.2 蛋白最佳包被浓度的确定

随着 VP1 蛋白包被量的减少, 测得 FMDV 阴性血清及阳性血清的化学发光值均不断降低, 当包被抗原为 1:40 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 稀释时, P/N 值较大, 且阴性血清的化学发光值较小, 结果见表 1。因此可以确定在 VP1-CLEIA 方法中 VP1 蛋白的最佳包被浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 最佳封闭条件的确定

以抗原最佳包被浓度包被酶标板, 选用 3% BSA-PBST, 1% 明胶-PBST, 10% 新生牛血清-PBST, 3% Casein+1% 蔗糖-PBST 混合液 4 种封

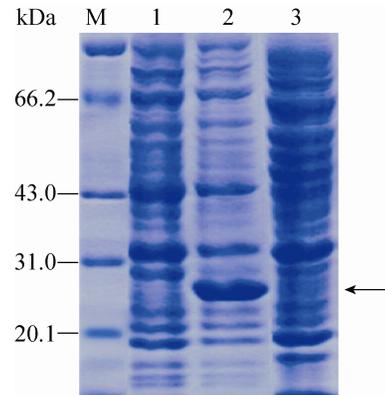


图 1 诱导表达 Rosetta-*pET-28a-VP1* 重组菌株的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Expression of VP1 as identified by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker 1: un-induced Rosetta-*pET-28a-VP1*; 2: the pellet of the post-induced bacterial lysates from ultrasonic disruption; 3: the supernatant of the bacterial lysates from ultrasonic disruption.

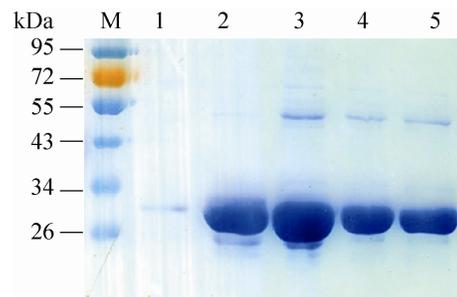


图 2 表达产物纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Purification of VP1 analyzed by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker; 1: flow through; 2-8: purification sample of VP1.

表 1 VP1-CLEIA 抗原最佳包被浓度的选择

Table 1 Determination of coating concentration for VP1-CLEIA

Coating concentration of antigen	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
P	1 986 836	1 702 389	1 395 793	1 016 896	897 651
N	52 557	35 681	21 266	21 789	21 832
P/N	37.80	47.71	65.63	46.67	41.11

闭液进行比较,分别在 37 °C 条件下封闭 60、90、120 min,比较 P/N 值。结果显示,3% Casein+1% 蔗糖-PBST 混合液的封闭效果最好。37 °C 条件下封闭 60 min 阴性本底较高,封闭 90 和 120 min 的结果差异不大。因此选用 3%酪蛋白+1%蔗糖-PBST 混合液作为封闭液,最佳封闭时间为 37 °C 封闭 90 min,结果见表 2。

2.4 酶标二抗工作浓度的确定

当 HRP-羊抗猪 IgG 酶标二抗稀释度为 1:40 000 时,P/N 值最大,因此将该稀释度作为最佳酶标二抗稀释度,结果见表 3。

2.5 判定标准的确定

对 10 份猪 O 型 FMDV 阴性血清按以上确定的最适条件进行 VP1-CLEIA 检测以及 ELISA 检测(武汉科前),每份血清重复两孔。10 份血清化学发光值的平均值 (x_1) 和标准差 (s_1) 分别为 28 033.25 和 1 553.87。因此初步确定 VP1-CLEIA 阴阳血清临界值为 x_1+2s_1 ,即 31 141。10 份血清经 ELISA 检测后 OD_{630} 的平均值 (x_2) 和标准差 (s_2) 分别为 0.12 和 0.03。因此初步确定 ELISA 试剂盒阴阳血清临界值为 x_2+2s_2 ,即 0.18。

表 2 VP1-CLEIA 最佳封闭条件的确定

Table 2 Determination of blocking condition for VP1-CLEIA

Blocking solutions	Chemiluminescent values	Blocking time (min)		
		60	90	120
3% BSA-PBST	P	1 425 139	1 395 690	1 396 890
	N	42 103	33 876	35 982
	P/N	33.85	41.20	38.82
1% Gelatin-PBST	P	1 721 679	1 658 843	1 663 312
	N	54 671	49 672	49 711
	P/N	31.49	33.40	33.46
10% FBS-PBST	P	1 359 876	1 363 474	1 362 199
	N	38 971	35 512	35 347
	P/N	34.89	38.39	38.54
3% Casein+1% Sucrose-PBST	P	1 401 578	1 387 253	1 384 231
	N	26 914	21 190	21 249
	P/N	52.08	65.47	65.14

表 3 VP1-CLEIA HRP-羊抗猪 IgG 酶标二抗最佳稀释度的确定

Table 3 Determination of HRP conjugated IgG dilution for VP1-CLEIA

Chemiluminescent values	Goat-anti-swine-HRP dilution			
	1:5 000	1:10 000	1:20 000	1:40 000
P	1 974 887	1 844 934	1 696 176	1 432 740
N	94 766	53 709	39 527	25 434
P/N	20.84	34.35	42.91	56.33

对 10 份经正向间接血凝试验判定抗体效价为 1:32 的猪 O 型 FMDV 标准血清按以上确定的最适条件进行 VP1-CLEIA 检测, 每份血清重复两孔。10 份血清化学发光值的平均值 (\bar{x}_3) 和标准差 (s_3) 分别为 108 322.80 和 9 532.36。因此初步确定是否免疫合格的临界值为 \bar{x}_3+2s_3 , 即 127 388。

2.6 VP1-CLEIA 的特异性

使用 VP1-CLEIA 检测了其他 4 种常见的猪传染病免疫后阳性血清以及 2 种其他亚型猪 FMDV 免疫后阳性血清, 结果均为阴性, 同时猪 O 型 FMDV 阳性对照及阴性对照分别检出为阳性和阴性, 证明建立的 VP1-CLEIA 方法具有良好的特异性 (表 4)。

2.7 VP1-CLEIA 的灵敏度

将已标定抗体效价为 1:512 的猪 O 型 FMDV 阳性标准血清用封闭液从 1:32 开始做倍比稀释, 分别用建立的 VP1-CLEIA 方法和武汉科前生物的 ELSIA 试剂盒进行检测。结果显示 VP1-CLEIA 方法检测血清样本在 1:2 048 稀释时仍可判为阳性, ELSIA 试剂盒在 1:1 024

稀释时可判为阳性。提示建立的 VP1-CLEIA 方法灵敏度优于 ELSIA 方法 (表 5)。

2.8 VP1-CLEIA 的重复性

结果显示, 板内重复性试验的变异系数在 1.10%–6.70% 之间, 板间重复性试验的变异系数在 0.66%–4.80% 之间, 均小于 7%。表明同一份血清样本在同一批次制备抗原包被的化学发光板内变异系数较小, 具有良好的重复性。结果见表 6、表 7。

2.9 VP1-CLEIA 与 ELISA 方法的符合率

用本次建立的 VP1-CLEIA 方法检测采集自山东猪场的血清样本 200 份, 用 2.5 确定的免疫合格标准判定结果, 检测结果与武汉科前生物生产的猪 O 型口蹄疫 ELISA 抗体检测试剂盒进行对比, 两者符合率为 93.50%。用本次建立的 VP1-CLEIA 方法检测采集自山东、辽宁、河北等地接种过灭活疫苗猪场的血清样本 50 份, 用 2.5 确定的阴阳性血清标准判定结果, 检测结果与国标试剂盒 O 型口蹄疫病毒液相阻断 ELISA 试剂盒的检测结果进行对比, 两者符合率为 94.00% (表 8)。

表 4 VP1-CLEIA 的特异性

Table 4 Specificity of VP1-CLEIA

Serum	PRV	CSFV	PPV	PVC	FMDV (Serotype A)	FMDV (Serotype Asia 1)	FMDV (+)	FMDV (-)
Chemiluminescent values	31 120	27 623	19 981	23 809	30 950	29 887	1 345 189	22 908
Results	-	-	-	-	-	-	+	-

表 5 VP1-CLEIA 的灵敏度

Table 5 Sensitivity of VP1-CLEIA and ELISA

Serum dilutions	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1 024	1:2 048	1:4 096
VP1-CLEIA	1 315 012	1 078 269	729 071	396 782	308 799	129 860	53 076	27 022
ELISA Kit	1.96	1.58	0.87	0.67	0.46	0.29	0.17	0.15

表 6 VP1-CLEIA 的板内重复性

Table 6 Intro-batch reproducibility for VP1-CLEIA

Serum No.	Chemiluminescent values				Average value	Standard deviation	CV (%)
	1	2	3	4			
1	1 162 723	1 168 361	1 156 598	1 140 187	1 156 967	12 175	1.10
2	259 517	246 727	249 185	256 013	252 861	5 927	2.30
3	102 764	99 088	99 717	99 102	100 168	1 756	1.80
4	28 887	25 539	29 199	26 325	27 488	1 829	6.70

表 7 VP1-CLEIA 的板间重复性

Table 7 Inter-batch reproducibility for VP1-CLEIA

Serum No.	Chemiluminescent values				Average value	Standard deviation	CV (%)
	1	2	3	4			
1	1 163 001	1 149 959	1 167 382	1 156 103	1 159 111	7 667	0.66
2	250 244	249 266	255 715	258 279	253 376	4 329	1.70
3	123 271	116 801	116 326	109 513	116 478	5 621	4.80
4	28 996	26 825	28 836	29 659	28 579	1 222	4.30

表 8 VP1-CLEIA 与间接 ELISA 以及液相阻断 ELISA 的符合率

Table 8 Agreement between VP1-CLEIA and indirect ELISA or liquid phase block ELISA

Detecting methods	VP1-CLEIA			Coincidence rates (%)
	Positive sample counts	Negative sample counts		
Indirect ELISA kit	Positive sample counts	162	2	93.50
	Negative sample counts	11	25	
Liquid phase block ELISA kit	Positive sample counts	42	0	94.00
	Negative sample counts	3	5	

3 讨论

本试验选择大肠杆菌系统表达的 VP1 重组结构蛋白代替病毒颗粒作为包被抗原,初步建立了猪 O 型 FMDV 感染后和疫苗免疫后血清中针对 VP1 结构蛋白抗体的 CLEIA 检测方法。VP1 结构蛋白是 O 型 FMDV 产生中和抗体的主要蛋白,检测针对 VP1 蛋白的抗体水平可用于评价 FMDV 疫苗的免疫效果,而且 VP1 蛋白也是检测 FMDV 抗体应用最广的检测抗原^[19]。传统的 ELISA 方法主要是使用 BHK 细胞培养的

FMDV 作为抗原包被,虽然特异性和灵敏度均较高,但在生产的过程中存在病毒扩散的风险,且成本较高^[20],因此为降低安全隐患和生产成本,并使操作更为简便,本试验选用大肠杆菌系统表达的 VP1 重组蛋白作为包被抗原。

动物感染 FMDV 或经口蹄疫灭活疫苗免疫后,体内均会出现针对 VP1 结构蛋白的抗体,因此 O 型 FMDV 的 VP1 结构蛋白 CLEIA 检测方法既可以用于检测病毒感染后动物体内抗体水平,还可以用于疫苗免疫后动物体内抗体水

平的监测。因此本试验在确定判定标准时,考虑到检测者的不同需求,制定了是否存在病毒感染及是否免疫合格两个判定标准。鉴别诊断 FMDV 疫苗免疫动物和自然感染动物的关键在于动物体内是否产生针对非结构蛋白的抗体,因此在实际应用过程中,可以配合使用 FMDV 非结构蛋白检测试剂盒。

ELISA 检测方法敏感性高、操作简便,微量的样品即能引起高效的抗原抗体反应,但目前只能实现定性检测或半定量检测,且重复性有待提高^[21]。CLEIA 检测方法将免疫反应的特异性与化学发光分析的高灵敏性相结合,敏感性比普通 ELISA 高出一个数量级,灵敏度可与放射免疫分析法相媲美,且不存在放射污染等问题^[22],另外 CLEIA 检测方法的重复性好,批间及批内变异系数均明显低于 ELISA 方法,能够精确地进行定性及定量检测^[23]。今后可以通过建立标准曲线,实现抗体水平的定量检测。尽管 CLEIA 检测方法已被越来越多地应用于食品中药物残留以及人类疾病的检测^[24-26],但对于动物疫病的检测及疫苗免疫评价鲜有报道,本研究首次将该技术用于猪 O 型 FMDV 抗体的检测,通过对临床血清样本的检测可以看出,本次建立的 CLEIA 方法较 ELISA 方法具有更好的敏感性和精密度,与市售的间接 ELISA 试剂盒符合率达到 93.50%以上,与液相阻断 ELISA 的检测符合率为 94.00%,为更灵敏、精确的检测猪 O 型 FMDV 抗体水平的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Xie QG. Foot and Mouth Disease. Beijing: China Agricultural University Press, 2004: 1-2 (in Chinese).
- [2] Kitching P, Hammond J, Jeggo M, et al. Global FMD control-is it an option? *Vaccine*, 2007, 25(30): 5660-5664.
- [3] Animal husbandry and Veterinary Department of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. The Prevention and Treatment for Foot and Mouth Disease. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1994: 5-6 (in Chinese).
中华人民共和国农业部畜牧兽医司. 家畜口蹄疫及其防治. 北京: 中国农业科技出版社, 1994: 5-6.
- [4] Mackay DKJ, Bulut AN, Rendle T, et al. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 2001, 97(1/2): 33-48.
- [5] Van Maanen C, Terpstra C. Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *J Immunol Methods*, 1989, 124(1): 111-119.
- [6] Hamblin C, Barnett IT, Crowther JR. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *J Immunol Methods*, 1986, 93(1): 115-121.
- [7] Robiolo B, La Torre J, Maradei E, et al. Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests. *Vaccine*, 2010, 28(38): 6235-6241.
- [8] Lu QX, Liu C, Guo GP, et al. Establishment of indirect ELISA diagnose based on the VP1 protein of foot-and-mouth disease virus serotype A. *Acta Agri Boreali-Occidentalis Sin*, 2014, 23(1): 30-35 (in Chinese).
卢清侠, 刘畅, 郭官鹏, 等. A 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立. *西北农业学报*, 2014, 23(1): 30-35.
- [9] Song N, Wang FX, Sun N, et al. Purification of the recombinant structural protein of foot-and-mouth

- disease virus serotype O in swine and establishment of the indirect ELISA. *China Ani Husbandry Vet Med*, 2013, 40(12): 20–26 (in Chinese).
- 宋妮, 王凤雪, 孙娜, 等. 猪 O 型口蹄疫病毒重组结构蛋白的纯化及间接 ELISA 检测方法的建立. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(12): 20–26.
- [10] Lin JM. *Chemiluminescence-basic Principles and Applications*. Beijing: Chemical Press, 2004: 14 (in Chinese).
- 林金明. 化学发光基础理论与应用. 北京: 化学出版社, 2004: 14.
- [11] Wang C, Wu J, Zong C, et al. Chemiluminescence immunoassay and its application progress. *Chin J Anal Chem*, 2012, 1(40): 3–10 (in Chinese).
- 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法及其应用进展. *分析化学*, 2012, 1(40): 3–10.
- [12] Creton R, Jaffe LF. Chemiluminescence microscopy as a tool in biomedical research. *Biotechniques*, 2001, 31(5): 1098–1105.
- [13] He FY, Feng YJ, Wu P, et al. Establishment to chemiluminescent enzyme immunoassay for chloramphenicol. *Chin J Vet Drug*, 2012, 46(3): 25–29 (in Chinese).
- 何方洋, 冯月君, 吴鹏, 等. 氯霉素化学发光酶联免疫检测方法的建立. *中国兽药杂志*, 2012, 46(3): 25–29.
- [14] Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, et al. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*, 2004, 117(1): 27–36.
- [15] Zhang XS, Liu ZX, Zhao QZ, et al. Progress in the structure and function of RNA gene in the genome of foot and mouth disease virus. *Chin J Virol*, 2001, 17(4): 375–380 (in Chinese).
- 张显升, 刘在新, 赵启祖, 等. 口蹄疫病毒基因组 RNA 结构与功能研究进展. *病毒学报*, 2001, 17(4): 375–380.
- [16] Lu ZJ, Liu ZX. Research conditions of foot-and-mouth disease virus. *Chin J Vet Sci Tech* 2003, 33(2): 69–74 (in Chinese).
- 卢曾军, 刘在新. 口蹄疫病毒研究概况. *中国兽医科技*, 2003, 33(2): 69–74.
- [17] Zhang RX. Development of an indirect VP2-ELISA to detect antibodies of infected foot-and-mouth disease virus and a 8BF-ELISA kit using tandem epitopes of 3B to differentiate infected from vaccinated cattle [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- 张润祥. 牛口蹄疫病毒 VP2-ELISA 和 3B 表位串联肽间接 ELISA 试剂盒的研制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [18] Ye WM, Han HX, Fan LY, et al. Simple and rapid determination of trace proteins by Bradford colorimetric method. *Lab Med*, 1996, 4(1): 207–208 (in Chinese).
- 叶伟民, 韩焕兴, 范列英, 等. Bradford 比色法简便快速测定微量蛋白. *检验医学*, 1996, 4(1): 207–208.
- [19] Wang JH, Liang CM, Peng IM, et al. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2003, 21: 3721–3729.
- [20] Wang GH, Du JZ, Cong GZ, et al. Establishment of indirect ELISA diagnose based on the VP1 structural protein of foot-and-mouth disease virus in pigs. *Chin J Biotech*, 2007, 9(23): 961–966 (in Chinese).
- 王光华, 独军政, 丛国正, 等. 猪口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白抗体间接 ELISA 方法的建立. *生物工程学报*, 2007, 9(23): 961–966.
- [21] Zhu HX. Comparison of the effect of chemical luminescence method and enzyme linked immunosorbent assay in the serum of hepatitis B virus. *Contemp Med*, 2010, 6(16): 89–90 (in Chinese).
- 朱火星. 化学发光法和酶联免疫法应用于乙肝病毒血清学效果比较. *当代医学*, 2010, 6(16): 89–90.
- [22] Xu CL, Peng CF, Hao K, et al. Determination of clenbuterol residual by chemiluminescent enzyme immunoassay. *Chin J Anal Chem*, 2005, 33(5): 699–702 (in Chinese).
- 胥传来, 彭池方, 郝凯, 等. 化学发光酶免疫方法检测克伦特罗残留. *分析化学*, 2005, 33(5):

- 699–702.
- [23] Zhang SS, Jiang SF, Bai JH. Progress of chemiluminescence immunoassay. *J Qingdao Inst Chem Technol*, 1992, 13(1): 98–103 (in Chinese).
张书圣, 江淑芙, 白洁洪. 化学发光酶联免疫分析的进展. *青岛化工学院学报*, 1992, 13(1): 98–103.
- [24] Zheng JF, Zhang F, Lü L. Preparation of an AOZ chemiluminescence-ELISA kit. *J Univ Jinan: Sci Tech*, 2012, 10(26): 366–369 (in Chinese).
郑俊峰, 张峰, 吕丽. AOZ 化学发光酶联免疫检测试剂盒的研制. *济南大学学报:自然科学版*, 2012, 10(26): 366–369.
- [25] Zhou QY, Zhang NN. Application of double antigen sandwich chemiluminescence detection for hepatitis C virus antibody. *Labeled Immunoassay Clin Med*, 2016, 23(3): 324–326 (in Chinese).
周齐洋, 张娜娜. 丙型肝炎病毒抗体双抗原夹心法化学发光检测的应用. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(3): 324–326.
- [26] Wei GW, Yu YP, Wei WK, et al. Progress on chemiluminescence immunoassay technique and its application. *Prog Vet Med*, 2010, 31(3): 97–102 (in Chinese).
魏光伟, 余永鹏, 魏文康, 等. 化学发光免疫分析技术及其应用研究进展. *动物医学进展*, 2010, 31(3): 97–102.

(本文责编 陈宏宇)