

口蹄疫病毒非结构蛋白 3AB 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

付元芳^{1*}, 何伟^{1,2*}, 孙普¹, 杨林¹, 包慧芳¹, 曹轶梅¹, 白兴文¹, 李平花¹, 李冬¹, 陈应理¹, 刘磊², 卢曾军¹, 刘在新¹

1 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 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

2 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

付元芳, 何伟, 孙普, 等. 口蹄疫病毒非结构蛋白 3AB 双抗体夹心 ELISA 方法的建立. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2357-2366.

Fu YF, He W, Sun P, et al. Development of a sandwich ELISA for detecting 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2357-2366.

摘要: 抗原纯净度是口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 灭活疫苗质量检验的一项重要内容, 一般采用疫苗 2-3 次免疫动物后, 检测非结构蛋白 (Non-structural protein, NSP) 抗体是否阳转, 判断疫苗抗原的纯净度。文中旨在建立定量检测 FMD 灭活疫苗抗原中 NSP 3AB 含量的 ELISA 方法, 为疫苗质量控制提供参考方法。利用口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) NSP 3A 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的 3B 单克隆抗体, 建立定量检测 NSP 3AB 含量的双抗体夹心 ELISA 检测方法。采用原核表达并纯化的 3AB 蛋白作为标准品, 标准品系列稀释, 绘制标准曲线, 以标准品与未加抗原的阴性对照吸光值 (OD) 的比值大于 2.0 的标准品最低浓度为最低检测限。标准品浓度介于 4.7-600.0 ng/mL 之间时, 测得的 OD 值与浓度呈线性相关, 回归曲线呈直线, 相关系数 $R^2=0.99$, 确定最低检测限为 4.7 ng/mL。检测 12 份未纯化灭活抗原中 3AB 蛋白含量介于 9.3-200.0 ng/mL 之间; 而纯化后的病毒抗原中 3AB 蛋白残留量低于最低检测限; 33 份来自不同厂家的成品疫苗抗原中 9 份疫苗抗原 3AB 蛋白含量在 9.0-74.0 ng/mL 之间, 其余 24 份疫苗抗原中 3AB 蛋白残留量低于最低检测限。检测 3AB 蛋白含量的双抗体夹心 ELISA 方法能够特异、敏感地检测疫苗抗原中的 3AB 蛋白含量, 为疫苗质量控制与纯净度检验提供了一种可供选择的检测方法。

关键词: 口蹄疫, 非结构蛋白, 定量 ELISA, 疫苗抗原纯净度

Received: March 20, 2020; **Accepted:** July 30, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0501500), Key Research and Development Program of Ningxia Province (No. 2019BBF02005).

Corresponding author: Zengjun Lu. Tel: +86-931-8343390; E-mail: luzengjun@caas.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划项目 (No. 2016YFD0501500), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2019BBF02005) 资助。

网络出版时间: 2020-08-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200810.1704.002.html>

Development of a sandwich ELISA for detecting 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus

Yuanfang Fu^{1*}, Wei He^{1,2*}, Pu Sun¹, Lin Yang¹, Huifang Bao¹, Yimei Cao¹, Xingwen Bai¹, Pinghua Li¹, Dong Li¹, Yingli Chen¹, Lei Liu², Zengjun Lu¹, and Zaixin Liu¹

¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Lanzhou 730046, Gansu, China

² College of Veterinary Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Antigenic purity is important for quality control of the foot-and-mouth (FMD) whole virus inactivated vaccine. The recommended method for evaluation the antigenic purity of FMD vaccine is to check the serum conversion to non-structural protein (NSP) 3AB antibody after 2 to 3 times inoculation of animals with inactivated vaccine. In this study, we developed a quantitative ELISA to detect the amount of residual 3AB in vaccine antigen, to provide a reference to evaluate the antigenic purity of FMD vaccine. Monoclonal antibody (Mab) of NSP 3A and HRP-conjugated Mab of NSP 3B were used to establish a sandwich ELISA to quantify the NSP 3AB in vaccine antigen of FMD. Purified NSP 3AB expressed in *Escherichia coli* was serially diluted and detected to draw the standard curve. The detectable limit was determined to be the lowest concentration of standard where the ratio of its *OD* value to *OD* blank well was not less than 2.0. Results: The *OD* value was linearly correlated with the concentration of 3AB protein within the range between 4.7 and 600 ng/mL. The correlation coefficient R^2 is greater than 0.99, and the lowest detectable limit is 4.7 ng/mL. The amount of 3AB protein in non-purified inactivated virus antigen was detected between 9.3 and 200 ng/mL depending on the 12 different virus strains, whereas the amount of 3AB in purified virus antigen was below the lowest detectable limit. The amount of 3AB in 9 batches of commercial FMD vaccine antigens was between 9.0 and 74 ng/mL, whereas it was below the detectable limit in other 24 batches of commercial vaccine antigens. Conclusion: the sandwich ELISA established in this study is specific and sensitive to detect the content of 3AB protein in vaccine antigen of FMD, which will be a useful method for evaluation of the antigenic purity and quality control of FMD inactivated vaccine.

Keywords: foot-and-mouth disease, non-structural proteins, quantitative ELISA, vaccine antigen purity

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的高度接触性传染病, 主要易感动物为家养和野生的偶蹄动物^[1-2]。该病传播迅速, 可形成世界性大流行, 对养殖业和国际畜产品贸易具有严重影响, 是一种典型的“政治经济病”^[3-4]。世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, OIE) 将其列为必须报告的动物传染病, 我国农业农村部也将其列为一类动物疫病。对于大多数发展中国家, 接种 FMD 灭活疫苗是预防口蹄疫最为有效的手段, 灭活疫苗的主要成分是 FMDV 结构蛋白, 如果疫苗抗原的纯化工艺不过关, 疫苗抗原中仍然会残留部分的非结构蛋白 (NSP), 多次免疫后会造成 NSP 抗体的阳转, 影响通过检测 NSP 抗体区分免疫动物与自然感染动物的准确性, 不利于

免疫背景下感染状况的评价^[5-6], 影响口蹄疫免疫无疫区的国际认证, 因此, 口蹄疫疫苗抗原纯净度检验也就成为疫苗质量评价的一个重要内容^[7] (OIE, 2018)。

世界动物卫生组织 (OIE) FMD 诊断检测指南中推荐的 FMD 疫苗抗原纯净度检验评价方法是采用疫苗 2 次免疫至少 8 头牛后 (OIE, 2018), 检测 NSP 是否阳转, 以此评价灭活疫苗免疫是否会对感染状况的检测评估产生干扰。该检验方法免疫动物时间长, 并且耗费大量人力与物力, 因此, 疫苗生产企业希望有更简单、有效的标准化检测方法来代替动物免疫实验。Capozzo 等^[8]开发了一种化学发光免疫分析法, 可以在生产过程中定量口蹄疫疫苗抗原中的非结构蛋白, 进行疫苗质量控制; 李永亮等^[9]利用口蹄疫病毒非结构蛋白 3B 单克隆抗

体,建立了一种定量检测病毒培养液中 3B 蛋白的液相阻断 ELISA 方法,但是在检测的灵敏度方面仍存在问题。双抗体夹心 ELISA 方法是一种简便、灵敏、特异的检测方法,已广泛应用于多种疫苗的质量控制^[10-13]。本研究利用实验室制备的 FMDV NSP 3A 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 3B 单克隆抗体,建立了一种定量检测 FMD 疫苗抗原中 NSP 3AB 含量的双抗体夹心 ELISA 方法,以期为疫苗抗原纯净度检验提供一个可供参考的检测评价方法。

1 材料与方 法

1.1 抗体、抗原与疫苗

1.1.1 抗体和质粒

FMDV 非结构蛋白 3A 单克隆抗体^[14](浓度为 3 mg/mL)、HRP 标记的 3B 单克隆抗体^[15]和塞内卡病毒非结构蛋白 3AB 由本实验室制备并保存;重组质粒 pET30a-3AB^[16]由本实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)pLysE 为博大泰克公司产品,His 标签蛋白纯化凝胶购自南京金斯瑞生物科技有限公司,蛋白定量试剂盒 (Bradford) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 FMDV 全病毒灭活抗原

未纯化的 O/Mya98、O/CHA/99、O/HN/93、O/India/2001、A/SEA/97 FMDV 灭活抗原,为本实验室制备,并经过灭活检验;来自疫苗生产企业的 O/Mya/98、A/WH/09 纯化后灭活抗原,Asia1/JS/05 FMDV 灭活抗原为 2016 年生产保存的诊断用抗原。

1.1.4 成品灭活疫苗

来自不同口蹄疫灭活疫苗企业的疫苗成品详见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 3AB 融合蛋白的诱导表达与纯化

将重组质粒 pET30a-3AB 转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysE,挑取单克隆接种于 LB (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素)培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,

第 2 天以 1/100 的接种量接入新鲜的 LB 培养液(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素),培养至 *OD* 值约为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 5 h,最后离心收集菌体。用 SDS-PAGE 检测表达产物,同时以未诱导菌液作为对照;将表达产物用 Invitrogen 公司的 Probond purification system kit 纯化,纯化过程按照试剂盒说明书进行操作,用 SDS-PAGE 观察;同时用 Easy protein quantitation kit (Bradford) 进行蛋白定量,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 夹心 ELISA 反应条件的确定

用棋盘滴定法进行夹心 ELISA 抗体工作浓度的确定:用包被液 (0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液)将 3A 单克隆抗体作 3.0、1.0 和 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度稀释,横向加入酶标板各孔,100 μL /孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;用含 1%明胶的 PBS 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,用 1 \times PBST 连续洗板 3 遍,拍干;用 1 \times PBS 稀释标准 3AB 抗原至 1.0 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入 100 μL ,封板,室温振荡反应 2 h,洗板,拍干;用 1 \times PBST 将 HRP 标记的 3B 单克隆抗体进行 1:50 000、1:100 000、1:200 000 和 1:400 000 稀释,纵向加入酶标板各孔,100 μL /孔,封板,室温振荡孵育 1 h,洗板,拍干;加入 TMB 底物溶液避光反应 15 min;0.3 mol/L H_2SO_4 溶液终止反应,用酶标仪测定 450 nm 波长 *OD* 值。为了保证检测的敏感性,采用饱和浓度的 3A 单抗包被酶标板,以 *OD* 值变化较小时的 3A 单抗包被浓度为饱和包被浓度;以 *OD* 值达到 2.0 时的 3B 单抗最低浓度为其最适工作浓度。

确定 3A 与 3B 单抗的最适工作浓度之后,确定捕获 3AB 蛋白的最适反应时间。将标准品按 5、10、15、20、25、30、35、40 ng/mL 稀释,室温分别捕获 2、6、12 h;洗涤后,加入工作浓度的 3B 单抗,室温作用 1 h;PBST 洗涤后,同前加入底物显色并终止反应;以样品 *OD* 值与 PBS 对照的比值大于 2.0,且 3AB 蛋白浓度最低时,所用的时间为最适 3AB 蛋白捕获反应时间。

表 1 不同疫苗企业的口蹄疫灭活疫苗清单

Table 1 Inactivated FMD vaccines from different manufacturers

No.	Company	Vaccines	Batch No.
1	A	Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A for pigs (Re-O/Mya98/JSCZ/2013 strain+Re-A/WH/09 strain)	A181241J
2			A181136J
3		Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A for pigs (O/Mya98/BY/2010 strain+Re-A/WH/09 strain)	D181211J
4		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O (OJMS strain)	F190101J
5		Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A (O/HB/HK/99 strain+AF/72 strain, suspension culture)	1811004
6			1901003
7			1811002
8		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O in pigs (O/Mya98/XJ/2010 strain+O/GX/09-7strain)	1906001
9			1907001
10	B		1807001
11			1810001
12			1907002
13		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O (OS strain)	1906002
14			1907005
15			1907001
16	C	Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O for pigs (O/Mya98/XJ/2010 strain+O/GX/09-7 strain)	20180318
17			20180317
18		Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A (OHM/02 strain+AKT-III strain, suspension culture)	20180516
19			20180517
20		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O for pigs (O/Mya98/XJ/2010 strain+O/GX/09-7 strain)	JH180110
21	D		JH180309
22		Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A (OHM/02 strain+AKT-III strain, suspension culture)	JH180310
23			JH190403
24		Trivalent inactivated vaccines for foot-and-mouth disease type O, A and Asia 1 (OHM/02 strain+AKT-III strain+Asia1KZ/03 strain, suspension culture)	JH170208
25		Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A for pigs (Re-O/Mya98/JSCZ/2013 strain+Re-A/WH/09 strain, suspension culture)	18392254
26			18392080
27	E	Bivalent inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A (O/Mya98/BY/2010 strain+Re-A/WH/09 strain)	18371420
28		Trivalent inactivated vaccines for foot-and-mouth disease type O, A and Asia 1 (O/Mya98/BY/2010 strain+Asia1/JSL/ZK/06 strain+Re-A/WH/09 strain)	17351453
29		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O (OHM/02 strain)	2019015
30			2019015
31	F	Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O and A (OHM/02 strain+AKT-III strain, suspension culture)	2019016
32			2019010
33		Inactivated vaccine against foot-and-mouth disease type O for pigs (O/Mya98/XJ/2010 strain+O/GX/09-7 strain, suspension culture)	2019007

1.2.3 夹心 ELISA 操作流程

包被：用包被缓冲液 (0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释 3A 单克隆抗体至工作浓度, 100 μ L/孔加入酶标板, 封板, 4 $^{\circ}$ C 过夜 (12–18 h)。用 1 \times PBST 连续洗板 3 遍, 拍干。

封闭：加封闭液 (含 1%明胶的 PBS 溶液) 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 用 1 \times PBST 连续洗板 3 遍, 拍干。

加待测样品：用 1 \times PBS 稀释待测样品和对照样品, 每孔加入 100 μ L, 对照加两孔。封板, 室温振荡反应 6 h, 用 1 \times PBST 洗板 3 遍, 拍干。

加酶标二抗：用 1 \times PBST 稀释 HRP 标记的 3B 单克隆抗体至工作浓度, 每孔加入 100 μ L, 封板, 室温振荡孵育 1 h, 用 1 \times PBST 连续洗板 5 遍, 拍干。

加底物液显色：加入 TMB 底物溶液 100 μ L/孔,

室温避光反应 15 min。

终止反应测定 OD 值：每孔加入 100 μL 终止液 (0.3 mol/L H_2SO_4 溶液) 终止反应，用酶标仪测定 450 nm 波长 OD 值。

结果判定：样本 OD 值与 PBS 对照孔 OD 值的比值大于 2.0，确定为有 3AB 蛋白的界限值，然后根据标准曲线的回归方程，即可计算出样品中所含 3AB 蛋白的浓度。

1.2.4 标准曲线的绘制

用 1 \times PBS (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.4) 2 倍系列稀释 3AB 蛋白标准品，浓度依次为 600.0、300.0、150.0、75.0、37.5、18.8、9.4、4.7 ng/mL，采用上述夹心 ELISA 程序检测不同浓度 3AB 标准品的 OD 值，重复检测 6 次，通过计算每个浓度的平均值、标准差，并进行差异显著性分析 (*t* 检验)，从而确定该方法的检测范围；再以不同浓度 3AB 蛋白标准品所对应的 OD 值作为横坐标、以标准品的不同浓度作为纵坐标建立标准曲线，利用 Excel 软件中的 LINEST 函数进行线性回归分析，推导回归方程。

1.2.5 3AB 定量检测 ELISA 特异性评价

使用上述 3AB 定量 ELISA 方法检测 1 \times PBS、BHK 细胞培养液、胎牛血清 (FBS) 和塞内卡病毒非结构蛋白 3AB 等，评价该定量检测 ELISA 方法的特异性。

1.2.6 不同来源 FMDV 灭活抗原中 3AB 含量的检测

应用此方法分别检测纯化前后的不同血清型 FMDV 灭活抗原；检测来自 6 个 FMD 全病毒灭活疫苗生产企业的 33 个批次的口蹄疫全病毒灭活疫苗，先进行破乳处理，分别取疫苗和正戊醇按 9:1 混合，4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h 后 8 000 r/min 离心 10 min，破乳后取水相用于 3AB 含量检测，对比分析不同厂家不同批次疫苗中 3AB 蛋白的残留量。

1.2.7 标准品与灭活疫苗抗原中 3AB 蛋白 Western blotting 免疫印迹检测

将 200 倍浓度的标准品 (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 用 PBS

缓冲液 2 倍系列稀释后，取 50 μL 加等量上样缓冲液，煮沸约 5 min，取 10 μL /孔加入凝胶中，进行 SDS-PAGE；然后将分离后的蛋白条带转印至硝酸纤维素膜 (NC)，将膜放入含 10% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中室温封闭 1 h；PBST 洗 3 次后，加入工作浓度的 HRP-3B 单抗 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，室温孵育 1 h；PBST 洗涤 5 次，然后加入 ECL 化学发光底物显色，暗室中压 X 光片曝光，观察条带显色情况，以眼观有明显条带者判为阳性。

2 结果与分析

2.1 3AB 融合蛋白的诱导表达与纯化

收集诱导表达后菌体进行 SDS-PAGE，结果与未诱导的阴性对照相比有明显的融合蛋白表达带，分子质量约为 33 kDa，与理论值相符 (图 1)；纯化后的融合蛋白经 SDS-PAGE 分析，只有 1 条约 33 kDa 的蛋白带 (图 1)，纯度为 99%，蛋白定量测得浓度为 1.5 mg/mL。

2.2 双抗夹心 ELISA 的最佳反应条件

用不同浓度 3A 单克隆抗体和 HRP 标记 3B 单

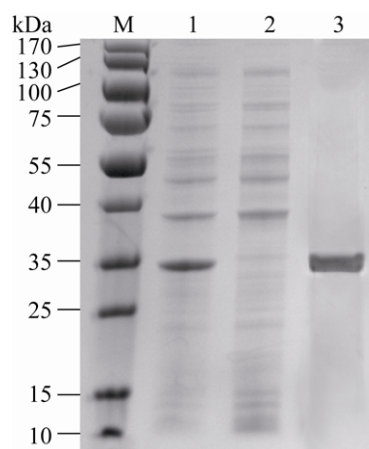


图 1 表达产物和纯化后蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 Analysis of expressed products and purified recombinant proteins by SDS-PAGE. Lane M is protein molecular weight marker; lane 1 shows 3AB recombinants induced with IPTG; lane 2 shows recombinants before induced with IPTG; lane 3 shows purified fusion proteins of 3AB.

克隆抗体进行棋盘滴定,以抗原孔 OD 值接近 2.0、未加抗原孔 OD 值 <0.1 为判定标准,结果显示,3A 单克隆抗体的饱和包被浓度为 $3.0 \mu\text{g/mL}$, 此时对应的 HRP 标记 3B 单克隆抗体的最适工作浓度为 $1:100\ 000$ (表 2)。

对比了 3A 单抗捕获 3AB 蛋白 2、6 与 12 h 的检测敏感性,以 3AB 蛋白的浓度作为横坐标、以不同浓度 3AB 蛋白测得 OD 值与阴性对照 OD 值的比值作为纵坐标绘制曲线,结果见图 2 所示。以最低检测浓度对应的 OD 值与阴性对照 OD 值的比值 ≥ 2.0 时,所对应的 3AB 标准品浓度为最低检测限,以此确定可达最低检测限的反应条件。由图 2 可见,3A 单抗的包被浓度为 $3.0 \mu\text{g/mL}$, 捕获 3AB 蛋白的时间为 6 h 时,标准品最低浓度对应的 OD 值与阴性对照 OD 值的比值为 2.0,捕获 6 h 与 12 h 的结果没有明显差异,由此确定该 ELISA 方法的最佳反应条件为 $3.0 \mu\text{g/mL}$ 3A 单克隆抗体包被酶标板,室温捕获 6 h 进行定量检测,确定为该夹心 ELISA 的最佳反应条件。在此条件下的 3AB 蛋白的最低检测限为 4.7 ng/mL 。

2.3 标准曲线与线性回归分析

采用双抗体夹心 ELISA 检测不同浓度的 3AB 蛋白标准品,6 次重复检测结果见表 3。对每个浓度标准品的 6 次检测数据进行差异显著性检验显示,每组检测数据的标准差都在 0.05 以内, t 检验的 P 值都大于 0.05,说明 6 次检测数值之间差异不显著。根据 6 次重复检测值的平均值绘制标准曲线 (图 3),推导出的回归方程为 $y=260.26x-27.094$,

表 2 夹心 ELISA 抗体工作浓度棋盘滴定结果
Table 2 Chess-board titration of antibodies for sandwich ELISA

HRP-3B Mab	3A Mab ($\mu\text{g/mL}$)			
	3.0	1.0	0.6	0.0
1:50 000	3.38	3.33	3.01	0.08
1:100 000	2.49	2.44	2.17	0.07
1:200 000	1.57	1.56	1.30	0.06
1:400 000	0.88	0.87	0.73	0.07

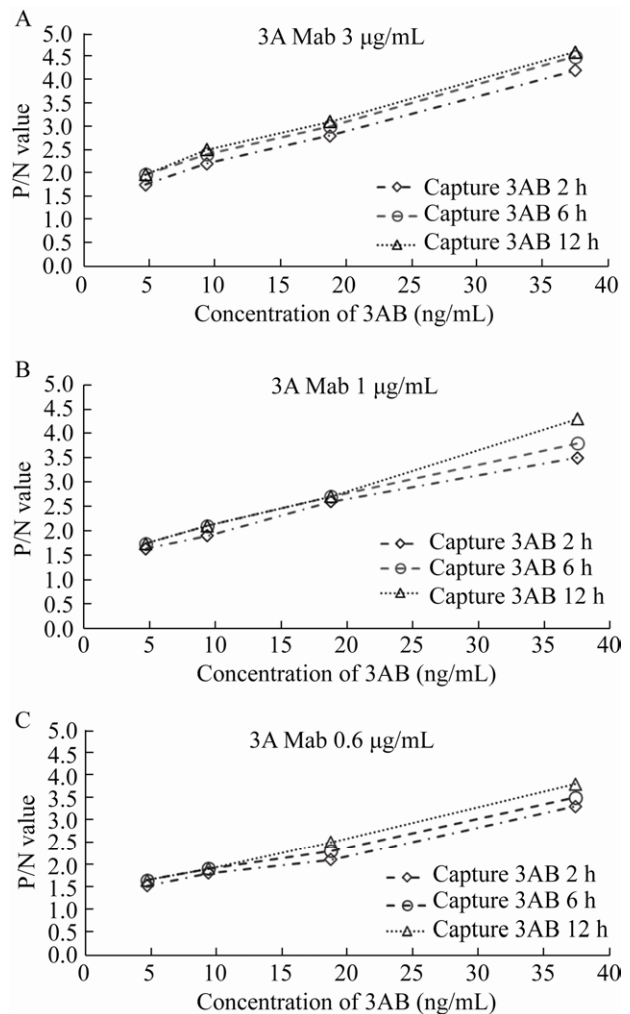


图 2 不同反应条件下检测 3AB 蛋白的最低浓度

Fig. 2 The lowest detectable limit of 3AB protein under different reaction condition. P/N value is the ratio of OD sample to OD negative control. (A) 3A Mab $3 \mu\text{g/mL}$. (B) 3A Mab $1 \mu\text{g/mL}$. (C) 3A Mab $0.6 \mu\text{g/mL}$.

相关系数 R^2 值为 0.995 7, 根据标准品的检测值, 确定 3AB 蛋白含量的检测范围为 $4.7\text{--}600.00 \text{ ng/mL}$ 。

2.4 夹心 ELISA 定量检测方法的特异性

夹心 ELISA 定量检测 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液、BHK 细胞培养液、含 2% 胎牛血清的细胞维持液和塞内卡病毒非结构蛋白 3AB, 重复检测 10 次以上其 OD 值均小于 0.05, 说明常规的病毒培养液对检测结果没有干扰, 与塞内卡病毒的 3AB 蛋白没有交叉反应, 证明该检测方法特异性好。

表 3 不同浓度 3AB 蛋白标准品的检测 OD 值

Table 3 The OD value of different concentrations of 3AB standards

3AB standards (ng/mL)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	M	SD	P value
600.0	2.51	2.18	2.25	2.32	2.38	2.47	2.35	0.10	$P>0.05$
300.0	1.30	1.32	1.27	1.31	1.39	1.26	1.31	0.03	$P>0.05$
150.0	0.76	0.81	0.78	0.70	0.67	0.79	0.75	0.04	$P>0.05$
75.0	0.47	0.38	0.45	0.46	0.45	0.47	0.46	0.02	$P>0.05$
37.5	0.25	0.20	0.21	0.26	0.22	0.23	0.24	0.03	$P>0.05$
18.8	0.16	0.14	0.15	0.15	0.13	0.16	0.15	0.01	$P>0.05$
9.4	0.12	0.11	0.12	0.13	0.12	0.11	0.12	0.01	$P>0.05$
4.7	0.10	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.01	$P>0.05$
0.0	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.01	$P>0.05$

Notes: T1–T6 shows OD value; M: mean; SD: standard deviation.

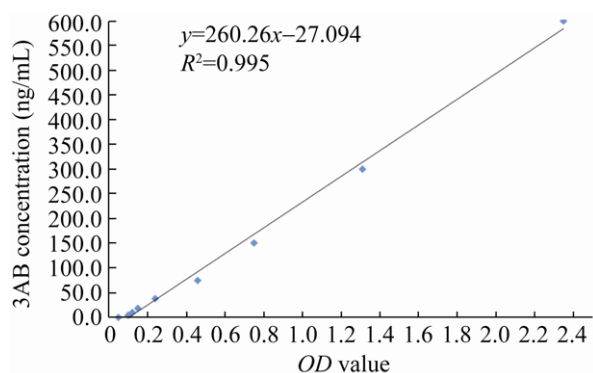


图 3 3AB 蛋白定量检测的标准曲线与回归分析

Fig. 3 Standard curve and regression analysis for quantification of 3AB protein.

2.5 夹心 ELISA 定量检测方法的实际应用

夹心 ELISA 定量检测 12 份未纯化灭活 FMDV 抗原、2 份纯化的灭活 FMDV 抗原, 33 份来自不同疫苗企业提供的口蹄疫灭活疫苗破乳后抗原, 结果见表 4。12 份未纯化灭活 FMDV 抗原中 3AB 蛋白量介于 9.3–200.0 ng/mL 之间; 而纯化后的 2 份 FMDV 抗原中 3AB 蛋白含量低于最低检测限。检测 33 份灭活疫苗抗原中的 3AB 含量, 其中有 9 份抗原中的 3AB 含量大于 10 ng/mL (表 4, 灭活疫苗编号为 5–7, 10–15), 其他 24 份疫苗抗原中 3AB 蛋白含量低于 4.7 ng/mL 的最低检测限 (表 4 中省略)。

2.6 Western blotting 免疫印迹检测

Western blotting 结果显示, 标准蛋白上样量依

次为 600.0、300.0、150.0、75.0、37.5、18.8、9.4 和 4.7 ng 时均出现特异性条带, 上样蛋白量为 2.4 ng 时未出现条带(图 4A); 33 份来自不同厂家的成品疫苗抗原中编号为 5、6、7、10、11、12、13、14 和 15 的 9 份疫苗出现了特异性条带(图 4B), 说明有 3AB 蛋白残留, 其余 24 份疫苗均未出现条带(图 4B)。

3 讨论

在灭活疫苗免疫背景下, 口蹄疫感染状况的监测依赖于检测 NSP 抗体, 因此, OIE 口蹄疫诊断标准中明确要求, 在申请认可口蹄疫免疫无疫区的国家或地区, 必须使用对 NSP 抗体检测没有干扰的抗原纯化灭活疫苗, 从而能够通过检测 NSP 抗体, 准确评价区域内免疫动物群体 FMD 的感染情况。目前, 评价灭活疫苗抗原纯净度的方法是通过两次动物免疫试验, 以 NSP 抗体是否阳转来进行判定。已有许多实验室对 FMDV NSP 3A、3B、3D、2C 和 3ABC 等非结构蛋白抗体的应答规律进行了研究, 并建立了对应的非结构蛋白抗体检测方法^[17-21], 其中检测 NSP 3AB 或 3ABC 抗体是鉴别感染与免疫动物的国际通用方法^[22-26], 所以检测疫苗抗原中 3AB 或 3ABC 蛋白的含量, 可以直接反映疫苗抗原的纯化程度, 指导疫苗的选择和使用, 也可为疫苗的质量控制提供参考方法。

表 4 五次重复定量检测口蹄疫病毒灭活抗原与商品化疫苗中 3AB 蛋白含量结果

Table 4 Quantification of 3AB protein in inactivated antigens of different strains of FMDV and commercial FMD vaccines (ng/mL)

Antigen	Strain	No.	T1	T2	T3	T4	T5	M	SD	
Unpurified inactivated antigen	O/Mya/98	171108	19.8	16.4	18.3	17.9	18.6	18.2	0.7	
		180524	9.6	8.7	10.9	8.6	9.3	9.4	0.6	
		180612	14.6	12.4	15.1	13.5	14.4	14.0	0.7	
		180720	15.8	18.6	17.4	16.2	17.9	17.2	0.8	
		181229	15.9	14.1	13.9	15.3	14.8	14.8	0.5	
	O/CHA/99	O/HN/93	181229	9.9	10.6	12.7	11.8	10.4	11.1	0.8
		O/India/2001	190218	15.4	13.1	14.6	15.5	16.2	15.0	0.7
		170330	74.7	70.1	72.6	69.8	71.4	71.7	1.3	
		A/Sea/97	180525	32.5	33.1	31.3	30.5	32.1	31.9	0.7
		180623	53.0	50.7	51.9	51.0	52.4	51.8	0.6	
Purified inactivated antigens	Asia1/JS/05	190218	21.8	19.9	22.3	20.4	21.0	21.1	0.6	
		161118	201	202.1	199.5	197.4	200	200.0	1.0	
	O/Mya/98	181022	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	0.0
		181022	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	<4.7	0.0
	Antigens in commercial vaccines	A/WH/09	5	49.0	35.0	57.0	72.0	50.0	52.6	9.5
			6	55.0	45.0	67.0	74.0	40.0	56.2	11.4
7			45.0	30.0	23.0	41.0	25.0	32.8	8.1	
10			70.1	70.7	75.5	74.5	63.5	70.86	4.7	
11			81.5	81.4	87.2	86.0	84.2	84.06	2.6	
12			61.7	62.4	66.4	65.5	71.4	65.48	3.9	
13			76.4	77.0	82.4	81.2	75.8	78.56	3.0	
14	85.8	86.2	92.5	91.1	89.6	89.04	3.0			
15	53.0	53.8	57.0	56.3	44.4	52.9	5.0			

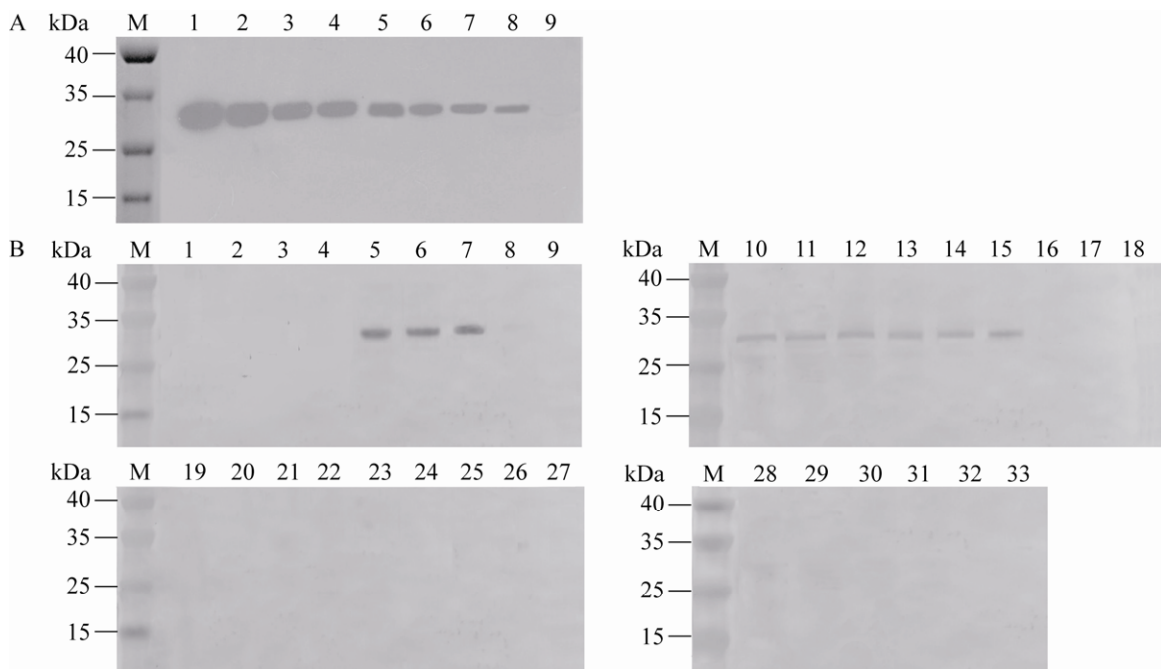


图 4 标准品 (A) 与不同厂家灭活疫苗 (B) 中 3AB 蛋白 Western blotting 分析

Fig. 4 Analysis of 3AB contents in standard samples and vaccine antigens by Western blotting. M is the protein molecular weight marker; lanes 1–9 in Figure A show the results for standard samples of 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7 and 2.4 ng per well of 3AB protein; lanes 1–33 in Figure B show the results for detection of 3AB protein in 33 batches of vaccine antigens.

本研究通过优化 ELISA 反应条件,在 3A 单抗饱和浓度 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被酶标板,6 h 捕获 3AB 蛋白,达到了最高的检测灵敏度,可检测标准品 3AB 蛋白的最低量为 4.7 ng/mL ,低于这一最低检测限时,则与空白对照没有差异。采用原核表达纯化的 3AB 蛋白为标准品,通过多次重复试验建立了相对稳定的标准曲线,样品浓度与 OD 值呈线性相关,多次重复检测标准曲线 R 值大于 0.99;由于检测样品的成分主要为细胞培养抗原,成分相对稳定,检测特异性好,结果准确。应用本方法检测成品疫苗抗原中 3AB 蛋白的含量时,检出一些批次的疫苗抗原中残留有 3AB 蛋白,通过免疫印迹试验也检测出 3AB 蛋白条带,说明所建立的 3AB 蛋白定量 ELISA 方法检测结果准确可靠,但免疫印迹试验不能定量,只能定性判断这些批次的疫苗抗原纯化不完全。这种未完全去除 NSP 3AB 蛋白的疫苗多次使用会造成免疫动物 3AB 抗体的阳转,对感染与免疫动物的鉴别诊断产生干扰。至于 3AB 蛋白残留量与免疫次数和抗体阳转率之间的关系,还需要进一步研究。

本研究中也发现,不同毒株的未纯化灭活抗原中 3AB 含量存在较大的差异,这可能与病毒的复制滴度、前体蛋白的加工程度有关,Asial 型病毒的灭活抗原中检测到的 3AB 含量达 200 ng/mL ,在 3 个血清型抗原中最高,这可能与 Asial 型病毒抗原产量高有关系。

本研究建立的定量检测 3AB 蛋白的 ELISA 方法,可以准确检测 FMDV 疫苗抗原中 3AB 蛋白的残留量,可以为疫苗抗原纯净度评价提供一定的参考,具有一定的应用价值。

致谢:感谢中农威特生物科技股份有限公司、中牧股份兰州生物药厂、天康生物股份有限公司制药一分公司、金宇保灵生物药品有限公司、内蒙古必威安泰生物科技有限公司、杨凌金海生物技术有限公司为本研究提供了口蹄疫病毒灭活疫苗,并提供了宝贵的建议,在此谢忱。

REFERENCES

- [1] Paton DJ, Gubbins S, King DP. Understanding the transmission of foot-and-mouth disease virus at different scales. *Curr Opin Virol*, 2018, 28: 85–91.
- [2] Lyons NA, Ludi AB, Wilsden G, et al. Evaluation of a polyvalent foot-and-mouth disease virus vaccine containing A Saudi-95 against field challenge on large-scale dairy farms in Saudi Arabia with the emerging A/ASIA/G-VII viral lineage. *Vaccine*, 2017, 35(49): 6850–6857.
- [3] Zheng YM, Jit M, Wu JT, et al. Economic costs and health-related quality of life for hand, foot and mouth disease (HFMD) patients in China. *PLoS ONE*, 2017, 12(9): e0184266.
- [4] Knight-Jones TJD, Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease — what are they, how big are they and where do they occur?. *Prev Vet Med*, 2013, 112(3/4): 161–173.
- [5] Chénard G, Selman P, Dekker A. Cedivac-FMD can be used according to a marker vaccine principle. *Vet Microbiol*, 2008, 128(1/2): 65–71.
- [6] Paton DJ, de Clercq K, Greiner M, et al. Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. *Vaccine*, 2006, 24(42/43): 6503–6512.
- [7] OIE (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health). Foot and mouth disease//OIE Standards Commission, Ed. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 8th ed. 2018. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
- [8] Capozzo AV, Martínez MR, Schielen WJG. Development of an in process control filtration-assisted chemiluminometric immunoassay to quantify foot and mouth disease virus (FMDV) non-capsid proteins in vaccine-antigen batches. *Vaccine*, 2010, 28(40): 6647–6652.
- [9] Li YL, Lu ZJ, Yang SZ, et al. The establishment of quantitative ELISA of foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3B. *China Biotechnol*, 2009, 29(11): 70–73 (in Chinese).
李永亮, 卢曾军, 杨苏珍, 等. 口蹄疫病毒非结构蛋白定量检测 ELISA 方法的建立. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(11): 70–73.

- [10] Niu YJ, Zhang P, Wang LY, et al. Development of double-antibody sandwich ELISA for rapidly quantitative detection of antigen concentration in inactivated SCRV vaccine. *Aquaculture*, 2020, 520: 734671.
- [11] Morgeaux S, Poirier B, Ragan CI, et al. Replacement of *in vivo* human rabies vaccine potency testing by *in vitro* glycoprotein quantification using ELISA—results of an international collaborative study. *Vaccine*, 2017, 35(6): 966–971.
- [12] Wang ZJ, Sun Y, Wu XF, et al. Development of a relative potency test using ELISA for human rabies vaccines. *Biologicals*, 2018, 55: 59–62.
- [13] Ming F, Cheng YQ, Ren CW, et al. Development of a DAS-ELISA for detection of H9N2 avian influenza virus. *J Virol Methods*, 2019, 263: 38–43.
- [14] Fu YF, Li PH, Cao YM, et al. Development of a blocking ELISA using a monoclonal antibody to a dominant epitope in non-structural protein 3A of foot-and-mouth disease virus, as a matching test for a negative-marker vaccine. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0170560.
- [15] Fu YF, Lu ZJ, Li PH, et al. Development of a blocking ELISA based on a monoclonal antibody against a predominant epitope in non-structural protein 3B2 of foot-and-mouth disease virus for differentiating infected from vaccinated animals. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e111737.
- [16] Zhu XM, Lu ZJ, Hu YH, et al. Expression of nonstructural protein 3AB gene of foot-and-mouth disease virus and analysis of its bioactivity. *J Agric Biotechnol*, 2008, 16(1): 15–19 (in Chinese). 祝秀梅, 卢曾军, 胡永浩, 等. 口蹄疫病毒非结构蛋白 3AB 基因的可溶性表达与反应原性的鉴定. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 15–19.
- [17] Shao JJ, Chang HY, Lin T, et al. Expression and utilization of 3AB nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(2): 180–184 (in Chinese). 邵军军, 常惠芸, 林彤, 等. 口蹄疫病毒非结构蛋白 3AB 的原核表达及应用. *生物工程学报*, 2011, 27(2): 180–184.
- [18] Colling A, Morrissy C, Barr J, et al. Development and validation of a 3ABC antibody ELISA in Australia for foot and mouth disease. *Aust Vet J*, 2014, 92(6): 192–199.
- [19] Hosamani M, Basagoudanavar SH, Tamil Selvan RP, et al. A multi-species indirect ELISA for detection of non-structural protein 3ABC specific antibodies to foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 2015, 160(4): 937–944.
- [20] Sharma GK, Mohapatra JK, Pandey LK, et al. Immunodiagnosis of foot-and-mouth disease using mutated recombinant 3ABC polyprotein in a competitive ELISA. *J Virol Methods*, 2012, 185(1): 52–60.
- [21] Ma JT, Lu ZJ, Cao YM, et al. Secreted expression of nonstructural protein gene 3ABC of foot-and-mouth disease virus in Sf9 cells and activity analysis. *Chin J Biotech*, 2007, 23(3): 540–545 (in Chinese). 马江涛, 卢曾军, 曹轶梅, 等. 口蹄疫病毒 NSP 3ABC 基因在昆虫细胞中的分泌表达及其活性检测. *生物工程学报*, 2007, 23(3): 540–545.
- [22] Sharma GK, Mohapatra JK, Mahajan S, et al. Comparative evaluation of non-structural protein-antibody detecting ELISAs for foot-and-mouth disease sero-surveillance under intensive vaccination. *J Virol Methods*, 2014, 207: 22–28.
- [23] Fukai K, Morioka K, Onozato H, et al. Comparative evaluation of three commercial ELISA kits for detection of antibodies to a nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus. *J Vet Med Sci*, 2013, 75(6): 693–699.
- [24] Bergmann IE, Neitzert E, Malirat V, et al. Development of an inhibition ELISA test for the detection of non-capsid polyprotein 3ABC in viral suspensions destined for inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Dev Biol (Basel)*, 2006, 126: 241–250.
- [25] Robiolo B, Seki C, Fondevilla N, et al. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine*, 2006, 24(7): 997–1008.
- [26] Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2006, 24(47/48): 6966–6979.

(本文责编 陈宏宇)