

猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及初步应用

廖园园,李 建,秦 伟,朱 薇,曹 娟,漆世华,谢红玲*,温文生

(武汉中博生物股份有限公司,武汉 430070)

[收稿日期] 2013-02-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0001-04 [中图分类号] S852.659.2

[摘 要] 用 PCV2 Cap 蛋白单克隆抗体预包被酶标板,将杆状病毒表达系统表达的 PCV2 Cap 蛋白作为检测用抗原,利用捕获包被法建立了间接 ELISA 法用于猪圆环病毒 2 型抗体的检测。通过优化 ELISA 条件,研制试剂盒并应用于圆环病毒 2 型疫苗的免疫效果检验。利用研制的试剂盒与 IFA、商品化进口和国产同类试剂盒对 178 份猪血清进行平行检测,总符合率分别为 96.63%、97.75% 和 84.27%,与其他几种常见猪病毒抗体阳性血清无交叉反应。试剂盒批内、批间变异系数分别为 2.35%~4.06% 和 4.87%~6.54%,2~8℃ 保存 15 个月稳定,适合于对不同来源猪圆环病毒 2 型疫苗人工免疫猪血清抗体进行检测。

[关键词] 猪圆环病毒 2 型;酶联免疫吸附试验;捕获包被;抗体检测

Development and Primary Application of ELISA Kit for the Detection of Antibody against Porcine Circovirus Type 2

LIAO Yuan-yuan, LI Jian, QIN Wei, ZHU Wei, CAO Juan, QI Shi-hua, XIE Hong-ling*, WEN Wen-sheng

(Wuhan Chopper Biological Co., Ltd, Wuhan 430070, China)

Abstract: With capture coating method, indirect ELISA method for detecting porcine circovirus type 2 (PCV2) antibody was established using PCV2 cap protein monoclonal antibody to pre-coat ELISA plate and using PCV2 cap protein expressed in baculovirus system as detecting antigen. The ELISA was optimized and the kit was developed for checking the immune results of PCV2 vaccines. Parallel testing on 178 porcine serums between the kit and IFA, imported and domestic commercial kits of the same type showed the total accordance rates being 96.63%, 97.75% and 84.27%, respectively, and there was no cross reactions between the kit and the positive serums of other several common porcine virus antibodies. The coefficients of variation of intra-batch and inter-batch kits were 2.35%~4.06% and 4.87%~6.54%, respectively. The shelf life of the kit was 15 months when storing at 2~8℃. Hence the kit was suitable for detecting the antibody in the serums of porcine immunized with PCV2 vaccines from different sources.

Key words: porcine circovirus type 2; ELISA; capture coating; antibody detection

作者简介:廖园园,硕士,从事动物病毒体外诊断试剂的研究。

通讯作者:谢红玲。E-mail:13419546263@163.com

猪圆环病毒(PCV)是迄今发现最小的动物病毒。现已知PCV有2个血清型,即PCV1和PCV2。PCV1为非致病性的病毒,PCV2为致病性的病毒,是断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的主要病原^[1]。除了引发PMWS外,PCV2还与猪皮炎肾炎综合征(PDNS)、猪增生性坏死性肺炎(PNP)、仔猪先天性震颤(CT)、母猪繁殖障碍等疾病相关^[2],是全球公认的危害养猪业的重要疫病^[3]。Cap蛋白是该病毒的主要结构蛋白,含有4个抗原表位,具有较好的免疫原性和抗原性,是检测该病毒特异性抗体的理想靶抗原表位^[4]。为建立一种敏感、特异、快速的猪圆环病毒2型抗体检测方法,使PCV2疫苗的效果评价更快捷、准确和方便,本研究利用捕获包被和间接ELISA法研制了一种检测PCV2抗体的试剂盒,并初步应用于猪圆环病毒2型疫苗免疫效果评价。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 PCV2病毒由本实验室保存;PCV2阳性质控猪血清及阴性质控猪血清、PCV1阳性猪血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)阳性猪血清、猪瘟病毒(CSFV)阳性猪血清、猪细小病毒(PPV)阳性猪血清、猪伪狂犬病毒(PRV)阳性猪血清由本实验室制备;178份猪血清样本采自湖北博牧猪场。

猪圆环病毒抗体检测试剂盒(进口),货号107SD310;猪圆环病毒2-dCap-ELISA抗体检测试剂盒(国产),批号111003;PCV2猪多抗由美国VMRD公司提供;羊抗猪荧光二抗由Thermo公司提供;HRP标记的小鼠抗猪IgG二抗由洛阳赛尔维实验器材有限公司提供;HRP标记的羊抗小鼠IgG二抗及TMB由Sigma公司提供;牛血清白蛋白(BSA),Ameresco公司;BCA蛋白定量试剂盒,GE公司;酶标板,深圳金灿华公司;其他化学试剂主要来自国药集团化学试剂公司(分析纯)。主要设备有包被机、洗板机、酶标仪、恒温孵育箱、荧光显微镜。

1.1.2 PCV2 Cap蛋白的制备 参见文献^[5],利用杆状病毒表达系统进行Cap蛋白表达,将纯化后的蛋白经BCA蛋白定量试剂盒定量后作为检测用抗原。

1.1.3 PCV2单抗的制备 参见文献^[5],应用杂交瘤技术制备分泌PCV2单抗的细胞株,利用小鼠腹水生产抗PCV2的单克隆抗体,纯化后的单抗经

BCA蛋白定量试剂盒定量后作为包被用抗体。

1.2 ELISA试剂盒的研制

1.2.1 反应条件的确定 按照方阵滴定方法优化ELISA反应条件,确定PCV2单克隆抗体和抗原的包被浓度。对一抗及二抗的最佳稀释度和反应时间进行优化。

1.2.2 判定标准的确定 取经间接免疫荧光试验(IFA)检测抗体阴性和PCR检测血清抗原阴性的猪血清40份,进行ELISA检测,统计平均OD_{450nm}值和标准差,计算阴阳性值的临界点。

1.2.3 敏感性、特异性和比较试验 取经IFA检测抗体阳性的PCV2猪阳性质控血清10份、取经IFA检测抗体阴性和PCR检测血清抗原阴性的阴性质控血清10份和PCV1阳性猪血清、PRRSV阳性猪血清、CSFV阳性猪血清、PPV阳性猪血清、PRV阳性猪血清各1份,共25份血清用本研究试剂盒进行ELISA检测,分析试剂盒敏感性和特异性。取178份猪血清样本用本研究试剂盒和IFA方法及商品化进口和国产两种试剂盒分别进行检测,分析符合率。

1.2.4 试剂盒组装、重复性及保存期试验 试剂盒由96孔抗原包被板、阳性和阴性对照血清、小鼠抗猪IgG酶标二抗、显色液A和B及终止液和10倍浓缩洗涤液组成。取3个不同批次的试剂盒,每批5个,分别检测PCV2阳性猪血清和阴性猪血清,计算批内及批间变异系数(CV)。将试剂盒置2~8℃保存,不同时间取样检测保存期。

1.2.5 人工免疫血清检测 选取21日龄非免疫健康易感仔猪30头,PCR检测血清PCV2病毒阴性,ELISA检测血清抗体效价低于1:50。用本实验室研究的基因工程疫苗及全病毒灭活疫苗及三种商品化疫苗(进口PCV2基因工程疫苗和国产全病毒灭活疫苗1及国产全病毒灭活疫苗2)进行常规免疫,每种疫苗免疫5头,留5头做空白对照,免疫后28d采血进行ELISA检测。

2 结果

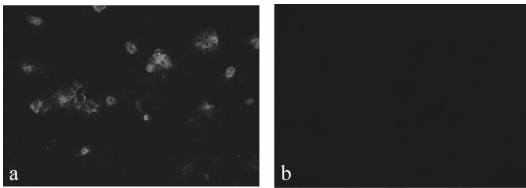
2.1 ELISA反应条件的确立 确定单抗最佳包被浓度为2 μg/mL,每孔100 μL,4℃孵育过夜,封闭液1% BSA,每孔200 μL,37℃封闭2 h后包被抗原,抗原最佳包被浓度为3 μg/mL,每孔100 μL,4℃孵育过夜,一抗1:100稀释,每孔100 μL,37℃反应45 min,二抗最佳稀释度为1:2000,每孔100 μL,37℃反应45 min,显色液A和B每孔各

50 μL,显色 10 min,2 mol/L 硫酸溶液终止,酶标仪 450 nm 读数。

2.2 判定标准的确定 使用本试剂盒检测经 IFA 检测抗体阴性和 PCR 检测血清抗原阴性的健康猪血清 40 份,求其平均 OD_{450nm} 值 = 0.181;标准差 = 0.068;按临界值 = 阴性样品平均值 + 3 × 标准差计算,其临界值为 0.385。所以待检血清 OD_{450nm} 值应 ≥ 0.4 判为阳性,待检血清 OD_{450nm} 值 < 0.385 判为阴性。在 0.385 ≤ OD_{450nm} < 0.4 范围内,为可疑,需进行第二次检测,如还在此区间判为阴性。

2.3 敏感性、特异性和比较试验结果 10 份阳性质控血清的 IFA 检测结果见图 1 和表 1,10 份阳性质控血清 ELISA 检测结果均为阳性,敏感性 100%,阳性质控血清 ELISA 检测最高稀释倍数

(ELISA 效价)可达 1 : 3200。10 份阴性质控血清和 5 份其他猪病毒抗体阳性血清 (PCV1、PRRSV、CSFV、PRV、PPV) 的 ELISA 检测结果均为阴性,特异性 100%。178 份猪血清样本的检测结果显示,本研究试剂盒和 IFA 方法及商品化进口和国产两种试剂盒的总符合率分别为 96.63% (172/178)、97.75% (174/178) 和 84.27% (150/178)。



(a: 阳性血清; b: 阴性对照)

图 1 猪血清 IFA 检测结果

表 1 阳性质控血清 ELISA 检测结果

检测项目	血清编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFA 效价	1 : 80	1 : 80	1 : 80	1 : 40	1 : 40	1 : 20	1 : 10	1 : 20	1 : 10	1 : 10
ELISA 结果 (OD _{450nm})	2.129	2.018	2.183	1.943	1.672	1.732	1.289	1.498	0.683	0.732
ELISA 效价	1 : 1600	1 : 3200	1 : 1600	1 : 1600	1 : 800	1 : 800	1 : 200	1 : 400	1 : 100	1 : 100

2.4 重复性和保存期试验结果 取 3 个不同批次的试剂盒,每批 5 个,分别检测 PCV2 阳性猪血清和阴性猪血清,批内变异系数为 2.35% ~ 4.06%,批间变异系数为 4.87% ~ 6.54%。保存期试验结果表明,2 ~ 8 ℃ 保存 15 个月稳定。

2.5 人工免疫血清检测结果 人工免疫猪血清检测结果阳性率均在 80% 以上,具体结果见表 2。两种国产全病毒灭活疫苗组分别各有一头免疫猪抗体呈阴性,分析原因可能与猪个体差异有关系,各猪产生抗体的时间和抗体水平不尽一致,也可能与疫苗质量有关系。

表 2 人工免疫猪血清检测结果

组别	28 d 血清抗体 (OD _{450nm})				
基因工程疫苗	2.178	1.389	1.934	1.032	1.692
全病毒疫苗	1.793	1.659	1.319	0.994	0.967
进口 PCV2 基因工程疫苗	0.413	1.256	0.758	1.404	0.645
国产全病毒灭活疫苗 1	1.085	0.353	0.557	1.043	0.481
国产全病毒灭活疫苗 2	0.631	0.582	0.929	0.711	0.329
空白组	0.062	0.075	0.092	0.103	0.068

3 讨论

PCV2 抗体检测对于进行 PCV2 流行病学调查、疫苗效果评价及试验用阴性猪的筛选等具有重

要意义。目前,PCV2 抗体检测的常用方法有病毒中和试验 (SN)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、间接免疫荧光试验 (IFA) 和免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA)。SN 及 IFA 和 IPMA 试验均需要结合细胞及病毒培养来进行检测,费时费力,对操作人员要求高,不适合推广和普及。本研究利用单抗捕获包被法建立了一种检测 PCV2 抗体的方法,并组装形成试剂盒。研究表明,试剂盒灵敏度和特异性良好,可重复性强,2 ~ 8 ℃ 保存 15 个月稳定。

本试剂盒研制的关键是利用 PCV2 单克隆抗体捕获 PCV2 Cap 蛋白进行包被板的制备,利用单克隆抗体的高特异性来进一步提高抗原包被板的抗原纯度和检测的敏感性及特异性。Cap 蛋白是 PCV2 病毒的主要结构蛋白,是检测该病毒特异性抗体的理想靶抗原。市场上国产同类 ELISA 试剂盒主要有浙江大学研制、瑞普 (保定) 生物药业有限公司生产的猪圆环病毒 2 - dCap - ELISA 抗体检测试剂盒^[6],该试剂盒中所采用的抗原是原核系统表达的蛋白^[7]。本试剂盒中的 Cap 蛋白来源于昆虫杆状病毒表达系统,本系统表达外源蛋白产量高、表达的 Cap 蛋白能独立地形成病毒样颗粒^[8],保持天然病毒空间构象结构、免疫活性好且产物易纯化、反应背景低,已在多种动物疫病诊断中得到

布鲁氏菌 omp28 基因的克隆、表达及重组蛋白的反应原性分析

王秀丽,蒋玉文*,毛开荣,丁家波,程君生,王楠

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2012-12-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0004-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 本研究克隆了羊种布鲁氏菌 16M 株、羊种布鲁氏菌 M28 株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌 A19 株、猪种布鲁氏菌 S2 株的 omp28 基因并对以上不同种菌株的 omp28 基因序列及编码的氨基酸序列进行了比对,结果显示不同种布鲁氏菌 omp28 基因之间仅 6 个碱基不同,而且只有 2 个氨基酸不同,亲水性分析结果显示两处氨基酸的差异对蛋白亲水性不造成影响。将羊种布鲁氏菌 16M 的 omp28 基因亚克隆到 pET32a 中表达,OMP28 在低温下诱导以可溶性形式高效表达。Western-blot 结果显示 OMP28 反应原性良好,是布鲁氏菌病诊断抗原的可能选择。

[关键词] 布鲁氏菌;omp28 基因;克隆表达;反应原性

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(20090327)

作者简介: 王秀丽,硕士,从事兽用生物制品的检验及研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail:jiangyuwen@ivdc.gov.cn

应用^[9]。比较试验结果表明,本试剂盒与 IFA 试验和商品化进口试剂盒的总符合率分别为 96.63% 和 97.75%,适合猪场血清抗体检测,对 PCV2 流行病学调查有重要意义;不同来源疫苗人工免疫血清检测结果表明,本试剂盒适合市场上基因工程疫苗和全病毒灭活苗的免疫猪血清抗体的检测,可用于疫苗效果评价和猪群免疫抗体水平的监测。

参考文献:

- [1] 李玉梅. 猪圆环病毒病的流行及诊断[J]. 养殖技术顾问, 2010,9:155.
- [2] 龚乾龙,王欢,邓治邦. 检测猪圆环病毒方法的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2010,(6):17-19.
- [3] 张燕霞,朱连德. 猪圆环病毒疫苗应用现状[J]. 猪业科学, 2011,(11):32-34.
- [4] Mahé D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000,

81:1815-1824.

- [5] 廖园园,朱薇,李建,等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2012,46(6):1-4.
- [6] 赵玉龙,焦玉兰,郁宏伟,等. 一种猪圆环病毒 II 型 ELISA 抗体检测试剂盒的临床应用[J]. 中国兽药杂志, 2011,45(3):31-34.
- [7] Shang S B, Li Y F, Guo J Q, *et al.* Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2[J]. Research in Veterinary Science, 2008,84(1):150-157.
- [8] Pornthippa Nawagitgul, Igor Morozov, Steven R Bolin, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. Journal of General Virology, 2000,81:2281-2287.
- [9] 刘长明,陆月华,张超范,等. 猪圆环病毒 2 型重组 Cap 蛋白在昆虫杆状病毒中的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2005,27(6):479-482.

(责任编辑:侯向辉)