

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.02.03

免疫小鼠血清中猪圆环病毒 2 型抗体 ELISA 检测试剂盒的研究

李 建, 张 敏, 薛 霜, 张飞雁, 朱 薇, 石宝兰, 漆世华, 李文静, 王碧群,
秦红刚, 韩 兴, 郑良益, 徐 松, 舒银辉, 冯 钊, 李婷婷, 谢红玲*

(国药集团动物保健股份有限公司, 武汉 430075)

[收稿日期] 2021-09-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 02-0019-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为研制一种小鼠血清中猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 抗体检测试剂盒, 以 PCV2 Cap 蛋白兔多抗作为包被用抗体, 捕获纯化的 PCV2 Cap 蛋白, 制备抗原检测板, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 建立检测小鼠血清中 PCV2 抗体 ELISA 检测方法并制备试剂盒。采用所制备的 ELISA 试剂盒对 50 份已知阴性血清样本进行检测, 临界 OD_{450nm} 值为 0.335; 采用 ELISA 试剂盒与 IFA 分别对 100 份血清检测, 总符合率为 96%, 检测小鼠血清敏感性效价达 1:16000, 与其他常见的猪病毒小鼠阳性血清无交叉反应, 2~8℃ 保存 15 个月稳定, 批内变异系数为 2.28%~4.17%, 批间变异系数为 4.27%~6.02%, 具有良好的敏感性、特异性、稳定性及重复性; 采用 ELISA 试剂盒对不同来源疫苗免疫组小鼠血清进行检测, 均显示良好效果。研究表明, 本研究制备的 ELISA 试剂盒可用于小鼠血清中 PCV2 抗体效价检测。

[关键词] 猪圆环病毒 2 型; 抗体; ELISA 试剂盒

Study on ELISA Kit for Detection of Porcine Circovirus Type 2 Antibody in Serum of Immunized Mouse

LI Jian, ZHANG Min, XUE Shuang, ZHANG Fei-yan, ZHU Wei, SHI Bao-lan, QI Shi-hua,
LI Wen-jing, WANG Bi-qun, QIN Hong-gang, HAN Xing, ZHENG Liang-yi,
XU Song, SHU Yin-hui, FENG Zhao, LI Ting-ting, XIE Hong-ling*

(Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China)

Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

Abstract: To develop a kit for detecting porcine circovirus type 2 (PCV2) antibody in mouse serum, PCV2 Cap protein rabbit polyclonal antibody was used as the coating antibody, the purified PCV2 Cap protein was captured

作者简介: 李 建, 博士研究生, 从事动物疫苗及体外诊断试剂研究工作; 张 敏, 硕士研究生, 从事动物疫苗及体外诊断试剂研究工作。二人为共同第一作者。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

to prepare an antigen detection plate, and horseradish peroxidase (HRP) labeled goat anti - mouse IgG was used as a secondary antibody, an ELISA method for detecting PCV2 antibody in mouse serum was established and a kit was prepared. The ELISA kit was used to detect 50 known negative serum samples, and the critical OD_{450 nm} value was 0.335. This ELISA kit and IFA were used to parallel detection of 100 serum samples, the total coincidence rate was 96%, and the sensitivity of mouse serum was detected. The titer was 1:16000, and there was no cross - reaction with other common pig virus mouse positive serum. It was stable for 15 months at 2~8℃. The intra - assay coefficient of variation was 2.28% to 4.17%, and the inter - assay coefficient of variation was 4.27% to 6.02%, with good sensitivity, specificity, stability and reproducibility. The serum of mice immunized with vaccines from different sources were detected by the ELISA kit, and all showed good results. In conclusion that the ELISA kit prepared in this study could be used for the detection of PCV2 antibody titer in mouse serum.

Key words: porcine circovirus type 2; antibody; ELISA kit

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)属于圆环病毒科圆环病毒属成员,包括猪圆环病毒 1 型(PCV1)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)和猪圆环病毒 3 型(PCV3)。PCV1 为非致病性病毒;PCV3 于 2016 年首次报道,其致病力、流行病学研究、分子生物学研究等刚处于初步研究阶段^[1];PCV2 对猪有致病性,是猪圆环病毒病的主要病原,给养猪业造成严重经济损失^[2]。

目前,接种疫苗是防控猪圆环病毒病的主要方法。猪圆环疫苗生产企业众多,疫苗质量参差不齐,因猪圆环病毒病对养殖业造成重大经济损失^[3],疫苗质量在出厂前十分重要。不同生产企业评判圆环疫苗质量标准不同,免疫动物后抗体水平检测作为评价疫苗质量的重要指标。由于非洲猪瘟疫情给养殖业带来的重大影响,实验猪来源受限以及经济方面考量,许多生产企业将圆环疫苗免疫小鼠后的抗体水平作为评价疫苗出厂前的质量标准之一。本研究建立了检测小鼠血清中 PCV2 抗体的 ELISA 方法,并研制出了 ELISA 检测试剂盒,可用于小鼠血清中 PCV2 抗体水平检测和 PCV2 疫苗质量评价。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 重组杆状病毒 CP08 株由国药集团动物保健股份有限公司研发中心实验室构建,HRP 标记羊抗小鼠 IgG (Sigma 公司),新西兰大白兔(购自湖北省疾病预防控制中心),超速离心

机(Beckman)等。

1.2 PCV2 Cap 蛋白的表达与纯化 将重组杆状病毒 CP08 株按照 0.5 MOI 接种到 Sf9 细胞中,27℃培养 72~96 h,收获细胞培养物,经 CsCl 密度离心^[4]纯化后进行 SDS - PAGE 电泳和电泳分析。

1.3 PCV2 Cap 蛋白兔多抗的制备 PCV2 Cap 蛋白常规免疫健康家兔^[5],待兔血清中 PCV2 抗体 ELISA 检测效价达 1:1000,即可采血分离血清。分离的血清通过辛酸 - 硫酸铵沉淀法进行纯化,获得所需抗 PCV2 Cap 蛋白纯化多抗。

1.4 试剂盒的研制

1.4.1 反应条件的确定 纯化的 PCV2 Cap 蛋白兔多抗经系列稀释包被酶标板,结合不同稀释浓度的 PCV2 Cap 蛋白,按照方阵滴定方法^[6]确定 PCV2 Cap 蛋白兔多抗和 PCV2 Cap 蛋白最佳包被浓度。对 ELISA 封闭液、酶标二抗稀释度、底物显色液及终止液进行优化^[7]。

1.4.2 试剂盒的组装 根据 1.4.1 中优化后的反应条件组装试剂盒,该试剂盒由 96 孔抗原检测板、阳性和阴性对照血清、羊抗小鼠 IgG 酶标二抗、显色液 A 和 B、终止液和 10 倍浓缩洗涤液组成。

1.4.3 判定标准的确定 选用间接免疫荧光试验(IFA)检测血清抗体阴性小鼠血清 50 份,用组装的试剂盒进行检测并对检测结果进行统计学分析,计算阴阳性值的临界点。

1.4.4 敏感性、特异性和比较试验 选取 6 份不同的 PCV2 抗体阳性小鼠血清,进行倍比稀释,检测所制备试剂盒的敏感性;分别对阴性小鼠血清、PRRSV、CSFV、PEDV 及 PRV 阳性小鼠血清进行检测,判断试剂盒的特异性;取 100 份小鼠血清样本用本研究试剂盒和 IFA 方法分别进行检测,分析符合率。

1.4.5 试剂盒重复性和保存期试验 取 3 个不同批次的试剂盒,每批 5 个,分别检测 PCV2 阳性小鼠血清和阴性小鼠血清,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。

1.4.6 试剂盒应用效果评估 选取 10 周龄 SPF 小鼠 50 只,用本公司研制的 PCV2 杆状病毒载体灭活疫苗(CP08 株)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 10 只小鼠,留 10 只小鼠做空白对照,免疫后 28 d 采血,用本研究试剂盒对免疫小鼠血清进行 ELISA 检测。

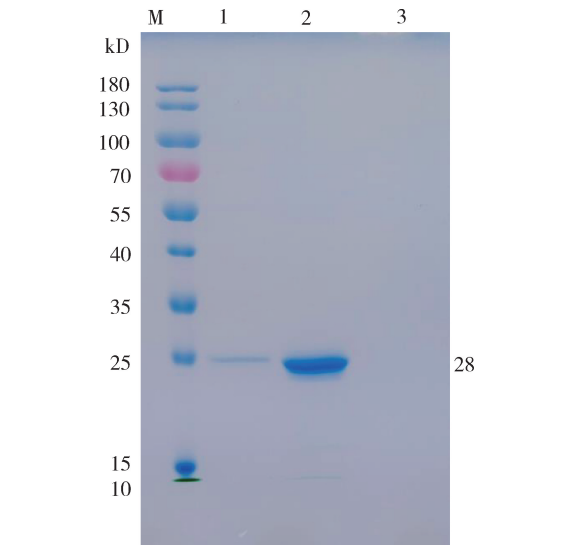
2 结果与分析

2.1 PCV2 Cap 蛋白表达、纯化与鉴定 将表达的 PCV2 Cap 蛋白经超滤浓缩,氯化铯密度梯度离心纯化,经 SDS-PAGE 鉴定,在 28 kD 左右可见条带(图 1);经铜网负染色,电镜下可见大量的病毒样颗粒(图 2)。

2.2 PCV2 Cap 蛋白兔多抗制备 PCV2 Cap 蛋白经 3 次免疫新西兰大白兔,血清 PCV2 Cap 蛋白抗体效价达 1:4000,分离血清经辛酸硫酸铵纯化,电泳结果见图 3。

2.3 试剂盒研制

2.3.1 反应条件的确定 确定 PCV2 Cap 蛋白兔多抗最佳包被浓度为 4 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,PCV2 Cap 蛋白抗原最佳包被浓度为 2 μg/mL,每孔 100 μL,4℃孵育过夜,一抗 1:100 稀释,每孔 100 μL,37℃反应 60 min,二抗最佳稀释度为 1:2000,每孔 100 μL,37℃反应



M: Marker; 1: 样品 1; 2: 样品 2; 3: 阴性对照

M: Marker; 1: Sample 1; 2: Sample 2; 3: Negative

图 1 SDS-PAGE 鉴定纯化 PCV2 Cap 蛋白

Fig 1 SDS-PAGE identification and purification of PCV2 Cap protein

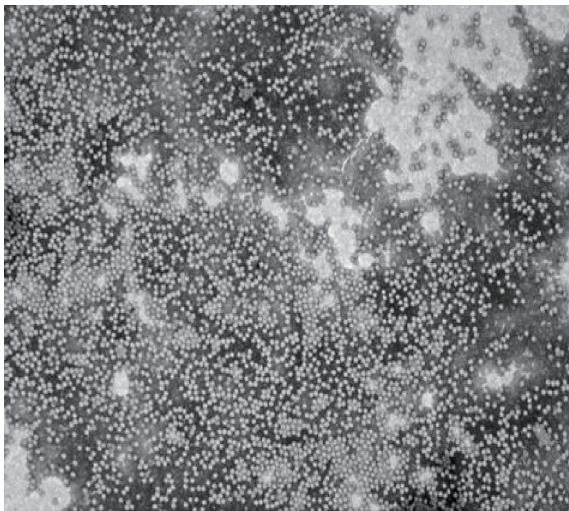


图 2 PCV2 Cap 蛋白电镜(负染,25000×)

Fig 2 PCV2 Cap protein electron microscope (Negative stain,25000×)

60 min,显色液 A 和 B 每孔各 50 μL,显色 10 min,2 mol/L 的硫酸终止,酶标仪 OD_{450 nm} 读数。

2.3.2 判定标准的确定 使用本试剂盒检测经 IFA 检测抗体阴性健康小鼠血清 50 份,求其平均 OD_{450nm} 值 0.152;标准差 = 0.061;按临界值 = 阴性样品平均值 + 3 × 标准差计算,其临界值为 0.335。

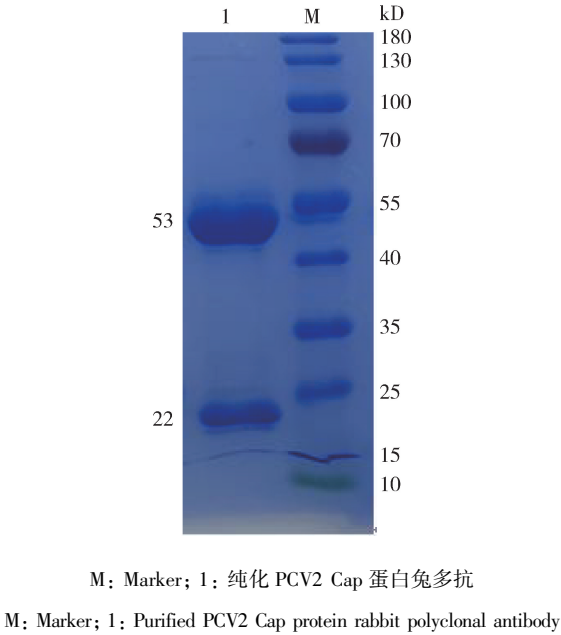


图 3 PCV2 Cap 蛋白兔多抗 SDS -PAGE 图

Fig 3 SDS -PAGE image of PCV2 Cap protein rabbit polyclonal antibody

所以待检血清 OD_{450nm} 值≥0.335 判为阳性,待检血清 OD_{450nm} 值<0.274 判为阴性。在 0.274≤OD_{450nm}<0.335 范围内,为可疑,需进行第二次检测,如还在此区间判为阴性。

2.3.3 敏感性、特异性和比较试验结果 6 份阳性小鼠血清 ELISA 检测结果均为阳性, ELISA 检测最高稀释倍数 (ELISA 效价) 可达 1:16000,结果见表 1;试剂盒对阴性小鼠血清和 4 份猪其他病毒抗体阳性小鼠血清 (PRRSV、CSFV、PEDV、PRV) 的 ELISA 检测结果均为阴性,特异性良好;100 份小鼠血清样本的检测结果显示,本研究试剂盒和 IFA 方法的总符合率为 96% (96/100),结果见表 2。

2.3.4 重复性和保存期试验 取 3 个不同批次的试剂盒,每批 5 个,分别检测 PCV2 阳性小鼠血清和阴性小鼠血清,批内变异系数为 2.28%~4.17%,批间变异系数为 4.27%~6.02%。保存期试验结果表明,2~8℃保存 15 个月稳定。

2.3.5 试剂盒应用效果评估 检测结果显示,不同疫苗免疫 28 日小鼠血清的 PCV2 抗体阳性率均在 100%,结果见表 3。依据免疫小鼠后抗体水平,

CP08 组抗体水平最高,进口组次之,国产组 1 抗体水平最低;依据免疫小鼠后各组抗体均匀性,各疫苗免疫组产生抗体一致性良好,国产组 1 均匀最好,进口组产生抗体均匀性稍差;各免疫组与对照组相比,差异极显著。结果见图 4 和表 3。

表 1 试剂盒检测小鼠血清结果

Tab 1 Reagent kit test results of mouse serum			
血清编号	ELISA 结果 (OD _{450nm})	ELISA 效价	IFA 效价
1	0.987	1:2000	1:100
2	1.021	1:4000	1:200
3	0.997	1:4000	1:200
4	0.665	1:8000	1:400
5	1.201	1:2000	1:100
6	0.776	1:16000	1:800

表 2 ELISA 试剂盒与 IFA 检测方法符合率

Tab 2 Compliance rate of ELISA kit and IFA method			
IFA 检测	ELISA 试剂盒检测		总计
	阳性	阴性	
阳性	72	0	72
阴性	4	24	28
总计	76	24	100

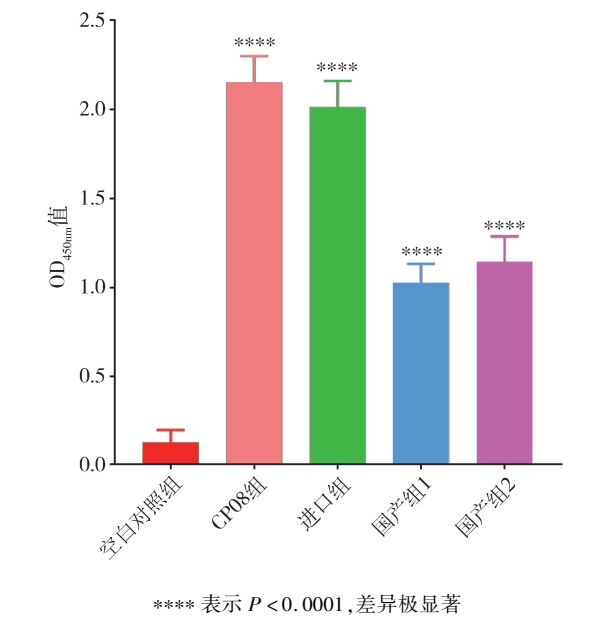


图 4 不同组别疫苗免疫小鼠差异性分析图

Fig 4 Analysis of the difference between different groups of vaccine - immunized mice

表 3 不同疫苗人工免疫小鼠血清效价检测结果

Tab 3 Test results of serum titer of artificially immunized mice with different vaccines

组别	28 日小鼠血清抗体(OD _{450nm})										平均值	方差
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
CP08 组	2.134	2.298	1.997	2.089	2.102	1.996	2.267	2.456	2.109	2.091	2.154	0.021
进口组	1.995	2.013	2.331	2.012	1.922	1.857	1.799	2.099	2.103	2.007	2.014	0.022
国产组 1	1.021	1.046	0.997	0.798	0.998	1.021	1.115	1.213	0.992	1.082	1.029	0.011
国产组 2	1.331	1.072	0.983	1.127	1.094	0.891	1.145	1.267	1.209	1.328	1.145	0.021
空白对照	0.083	0.196	0.116	0.105	0.281	0.044	0.123	0.058	0.179	0.108	0.129	0.005

3 讨 论

PCV2 抗体检测的常用方法有病毒中和试验(SN)、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、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^[8]。Cap 蛋白是 PCV2 病毒的主要结构蛋白,该蛋白成为基因工程疫苗首选抗原,是检测该病毒特异性抗体的理想靶抗原^[9-10]。

本研究利用兔多抗捕获包被法建立了一种检测小鼠血清 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。应用该试剂盒对 PCV2 疫苗免疫后的小鼠血清进行 PCV2 抗体检测,检测效果良好。当前,各疫苗生产企业对于猪圆环疫苗产品质量标准评判不同,免疫动物后检测其抗体水平作为其质量标准之一;目前,市场已有商品化检测猪圆环抗体试剂盒在售,均为检测猪血清中圆环抗体;由于非洲猪瘟疫情的影响导致动物来源困难以及经济方面的考量,许多圆环疫苗生产企业将免疫小鼠检测其血清抗体水平作为圆环疫苗质量标准的评判方法。本研究为圆环疫苗生产企业提供一种便捷的检测方法及产品,用以评判免疫小鼠后血清抗体水平,对于圆环疫苗销售前质量检测提供一种参考指标。同时,本研究试剂盒中的二抗替换为抗猪 IgG,可用于检测猪血清中猪圆环病毒抗体。本研究制备的检测小鼠血清中猪圆环抗体 ELISA 试剂盒,可作为疫苗生产企业评判圆环疫苗免疫小鼠后抗体水平的检测产品,为检测

小鼠血清 PCV2 抗体提供一种快速便捷方法,对于当前疫苗生产企业具有重要的经济价值^[11]。

参考文献:

[1] 张忠国. 近年来 PCV3 在国内外的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2017(12): 19-20.
Zhang Z G. The research progress of PCV3 at home and abroad in recent years[J]. Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology Information, 2017(12): 19-20.

[2] Han L, Yuan G F, Chen S J, *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in Hebei Province from 2016 to 2019: a retrospective study [J]. Archives of Virology, 2021, 166(8): 2159-2171.

[3] VenegasVargas Cristina, Taylor Lucas P, Foss Dennis L, *et al.* Cellular and humoral immunity following vaccination with two different PCV2 vaccines (containing PCV2a or PCV2a/PCV2b) and challenge with virulent PCV2d[J]. Vaccine, 2021(39): 5615-5625.

[4] 董金杰, 王凡, 陈苗苗, 等. 口蹄疫灭活疫苗 146S 含量检测方法概述[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(10): 78-79.
Dong J J, Wang F, Chen M M, *et al.* Summary of detection methods for 146S content of inactivated foot-and-mouth disease vaccine[J]. Shandong Animal Husbandry and Veterinary, 2017, 38(10): 78-79.

[5] 孙青, 赵兴红, 吴永革, 等. 肺炎链球菌表面抗原 PsaA-PspA 融合蛋白双抗夹心 ELISA 定量检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(8): 892-895.
Sun Q, Zhao X H, Wu Y G, *et al.* Development and verification of a double antibody sandwich ELISA for quantitative determination of PsaA-PspA fusion protein of *Streptococcus pneumoniae* surface antigen [J]. Chin J Biologicals, 2018, 31(8): 892-895.

[6] 王俊伟, 陈芳洲, 库旭钢, 等. 基于 PCV3-Cap 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立及临床应用[J]. 畜牧兽医学报,

- 2019, 50(02): 454–460.
- Wang J W, Chen F Z, Ku X G, *et al.* Establishment and clinical application of an indirect ELISA for detection of antibodies against PCV3 based on recombinant ORF2 protein[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(02): 454–460.
- [7] 于俊楠, 陈媛, 彭尧舜, 等. 猪圆环病毒 3 型夹心 ELISA 诊断方法的建立[J]. *福建畜牧兽医*, 2019, 41(02): 17–20.
- Yu J N, Chen Y, Peng X S, *et al.* Establishment and development of sandwich ELISA for diagnosis of porcine circovirus serum type 3 [J]. *Fujian Animal Husbandry and Veterinary*, 2019, 41(02): 17–20.
- [8] Mo X, Li X, Yin B, *et al.* Structural roles of PCV2 capsid protein N – terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type – specific neutralizing epitope [J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(3): e1007562.
- [9] Chen Q, Rong J, Li G, *et al.* Establishment of a Rep' protein antibody detection method to distinguish natural infection with PCV2 from subunit vaccine immunization[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69: 1183–1196.
- [10] Li Y Y, Lin Y, Xin G, *et al.* Comparative evaluation of ELPylated virus – like particle vaccine with two commercial PCV2 vaccines by experimental challenge [J]. *Vaccine*, 2020, 38(23): 3952–3959.
- [11] Mu Yang, Jia Cunyu, Zheng Xu, *et al.* A nanobody – horseradish peroxidase fusion protein – based competitive ELISA for rapid detection of antibodies against porcine circovirus type 2 [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021(02): 19–34.

(编辑:李文平)